

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6100367号
(P6100367)

(45) 発行日 平成29年3月22日 (2017.3.22)

(24) 登録日 平成29年3月3日 (2017.3.3)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 38/00 (2006.01)

A 6 1 K 37/02 Z N A

A 6 1 P 19/08 (2006.01)

A 6 1 P 19/08

A 6 1 P 19/10 (2006.01)

A 6 1 P 19/10

請求項の数 1 (全 41 頁)

(21) 出願番号 特願2015-517190 (P2015-517190)
 (86) (22) 出願日 平成25年6月14日 (2013.6.14)
 (65) 公表番号 特表2015-527973 (P2015-527973A)
 (43) 公表日 平成27年9月24日 (2015.9.24)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2013/005282
 (87) 国際公開番号 W02013/187730
 (87) 国際公開日 平成25年12月19日 (2013.12.19)
 審査請求日 平成26年12月17日 (2014.12.17)
 (31) 優先権主張番号 10-2012-0064302
 (32) 優先日 平成24年6月15日 (2012.6.15)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

前置審査

(73) 特許権者 514318677
 ザ アサン ファウンデーション
 大韓民国 138-736 ソウル ソン
 パーグ オリピック-ロ 43-ギル
 88 (ブナブ-ドン)
 (74) 代理人 100086759
 弁理士 渡邊 喜平
 (74) 代理人 100154184
 弁理士 生富 成一
 (72) 発明者 コ、 ジュン-ミン
 大韓民国 135-836 ソウル カン
 ナム-グ サムソン-ロ 151 #2-
 1201 (テチ-ドン、スンキョン ア
 パート)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 S l i t - R o b o システムを用いた骨折又は骨粗鬆症の予防或いは治療用組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

s l i t 3 の L R R 2 (leucine-rich repeat domain 2) ドメイン組換えペプチドを有効成分として含有する骨折又は骨粗鬆症の予防又は治療用薬学的組成物として、上記 s l i t 3 の L R R 2 ドメイン組換えペプチドは配列番号17の塩基配列中、2位～391位の塩基配列からなるドメイン組換えペプチドである骨折又は骨粗鬆症の予防又は治療用薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、S l i t、r o b o 又はその発現タンパク質を有効成分として含む骨折又は骨粗鬆症の予防或いは治療用薬学組成物、前記遺伝子又は発現タンパク質を用いた骨折又は骨粗鬆症の発生危険予測用キット、及び骨折又は骨粗鬆症の発生危険を予測するための情報提供方法に関する。

【背景技術】

【0002】

骨粗鬆症とは、骨を形成する無機質と基質の量が過度に減少し、骨密度が減少した状態を示すものであって、骨粗鬆症がある場合、骨が折れやすくなる。従って、骨粗鬆症は、低い骨密度 (bone mineral density ; BMD) 及び増加された骨折

の危険を有する最も頻繁な代謝性骨疾患 (metabolic bone disease; MBD) である (Peacock, M., et al., Endocr. Rev. 23: 303 - 326, 2002; Akhter, M. P., et al., Bone. 41 (1): 111 - 6, 2007)。最近になって、尻、脊椎及び手首等の一般的な骨粗鬆症性骨折で入院した患者が顕著に増加している (Fogarty, P., et al., Maturitas. 52 Suppl 1: S3 - 6, 2005; Palacios, S., et al., Maturitas. 15; 52 Suppl 1: S53 - 60. Review, 2005)。特に、40歳以降の女性には閉経による閉経後骨粗鬆症が高い頻度で現れ、70歳以降は男女を問わず老人性骨粗鬆症が発生する。

【0003】

10

現在、骨粗鬆症の診断は、X線撮影等の物理学的方法を通じて行われているが、この方法は、大規模な診断装置を必要とし、X線を使用することによる安全性等の問題があるだけでなく、今後の骨密度の減少を予め予測することができず、骨密度の数値だけでは正確に骨粗鬆症性骨折の危険がどのくらいか正確に予測するのは難しいという欠点を有している。

【0004】

従って、閉経後骨粗鬆症や老人性骨粗鬆症をはじめとして各種骨粗鬆症を早期に発見して診断し、骨折のリスクを予測することによって、効果的な治療を行えるようにする迅速かつ簡便であるとともに、正確な方法の確立が求められる。

【0005】

20

よって、本発明者は、骨折又は骨粗鬆症の治療剤、及び骨折或いは骨粗鬆症の発生危険予測用マーカーを開発するために研究を続けた結果、slit3が細胞及び動物モデルで骨形成を増加させ、骨吸収を減少させて、骨粗鬆症の発病率と負の相関関係を有していることを確認したことによって、本発明を完成した。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明の目的は、slit1、slit2、slit3、robo1、robo2及びvillseで構成された群から選択された遺伝子またはその発現タンパク質を有効成分として含有する骨折又は骨粗鬆症の予防或いは治療用薬学的組成物を提供することである。

30

【0007】

本発明のまた別の目的は、slit1、slit2、slit3、robo1、robo2及びvillseで構成された群から選択された遺伝子またはその発現タンパク質を有効成分として含有する骨折又は骨粗鬆症の予防或いは改善用食品組成物を提供することである。

【0008】

本発明のまた別の目的は、slit1、slit2、slit3、robo1、robo2及びvillseで構成された群から選択されたタンパク質を含む骨折又は骨粗鬆症の発生予測用マーカー組成物を提供することである。

【0009】

40

本発明のまた別の目的は、slit1、slit2、slit3、robo1、robo2及びvillseで構成された群から選択されたタンパク質またはその免疫原性断片に特異的に結合する抗体を含む骨折又は骨粗鬆症の発生予測用キットを提供することである。

【0010】

本発明のまた別の目的は、slit1、slit2、slit3、robo1、robo2及びvillseで構成された群から選択された遺伝子のmRNAを検出するためのRT-PCR用プライマを含む骨折又は骨粗鬆症の発生予測用キットを提供することである。

【0011】

50

本発明のまた別の目的は、骨折又は骨粗鬆症の発生予測に必要な情報を提供するために、患者の血液試料から抗原 - 抗体反応を介して、s l i t 1、s l i t 2、s l i t 3、r o b o 1、r o b o 2 及び v i l s e で構成された群から選択されたタンパク質を検出する方法を提供することである。

【 0 0 1 2 】

本発明のまた別の目的は、被検物質を処理した細胞で s l i t 1、s l i t 2、s l i t 3、r o b o 1、r o b o 2 及び v i l s e タンパク質の発現の水準を比較する段階を含む骨折又は骨粗鬆症治療剤のスクリーニング方法を提供することである。

【 0 0 1 3 】

本発明のまた別の目的は、s l i t 3 タンパク質の L R R 2 ドメインの組換えペプチド及びこれを含む骨折又は骨粗鬆症の予防或いは治療用薬学的組成物を提供することである。

10

【 0 0 1 4 】

本発明のまた別の目的は、s l i t 2、s l i t 3、r o b o 1、r o b o 2、r o b o 4 に位置する S N P を含む骨折又は骨粗鬆症の発生予測用マーカー組成物を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 5 】

前記目的を達成するために、本発明は、s l i t 1、s l i t 2、s l i t 3、r o b o 1、r o b o 2 及び v i l s e で構成された群から選択された遺伝子またはその発現タンパク質を有効成分として含有する骨折又は骨粗鬆症の予防あるいは治療用薬学的組成物を提供する。

20

【 0 0 1 6 】

また、本発明は、s l i t 1、s l i t 2、s l i t 3、r o b o 1、r o b o 2 及び v i l s e で構成された群から選択されたタンパク質を有効成分として含有する骨折又は骨粗鬆症の予防あるいは改善用食品組成物を提供する。

【 0 0 1 7 】

また、本発明は、s l i t 1、s l i t 2、s l i t 3、r o b o 1、r o b o 2 及び v i l s e で構成された群から選択されたタンパク質を含む骨折又は骨粗鬆症の発生予測用マーカー組成物を提供する。

30

【 0 0 1 8 】

また、本発明は、s l i t 1、s l i t 2、s l i t 3、r o b o 1、r o b o 2 及び v i l s e で構成された群から選択されたタンパク質またはその免疫原性断片に特異的に結合する抗体を含む骨折又は骨粗鬆症の発生予測用キットを提供する。

【 0 0 1 9 】

また、本発明は、s l i t 1、s l i t 2、s l i t 3、r o b o 1、r o b o 2 及び v i l s e で構成された群から選択された遺伝子の m R N A を検出するための R T - P C R 用プライマを含む骨折又は骨粗鬆症の発生予測用キットを提供する。

【 0 0 2 0 】

また、本発明は、骨折又は骨粗鬆症の発生予測に必要な情報を提供するために、患者の血液試料から抗原 - 抗体反応を介して、s l i t 1、s l i t 2、s l i t 3、r o b o 1、r o b o 2 及び v i l s e で構成された群から選択されたタンパク質を検出する方法を提供する。

40

【 0 0 2 1 】

また、本発明は、被検物質を処理した細胞で s l i t 1、s l i t 2、s l i t 3、r o b o 1、r o b o 2 及び v i l s e タンパク質の発現の水準を比較する段階を含む骨折又は骨粗鬆症治療剤のスクリーニング方法を提供する。

【 0 0 2 2 】

また、本発明の s l i t 3 タンパク質の L R R 2 ドメインの組換えペプチド及びこれを含む骨折又は骨粗鬆症の予防或いは治療用薬学的組成物を提供する。

50

【 0 0 2 3 】

また、本発明は、s l i t 2、s l i t 3、r o b o 1、r o b o 2、r o b o 4 に位置する S N P を含む骨折又は骨粗鬆症の発生予測用マーカー組成物を提供する。

【発明の効果】

【 0 0 2 4 】

本発明の s l i t または r o b o タンパク質は、細胞及び動物モデルで骨形成を増加させ、骨吸収を減少させて、骨粗鬆症の発病率と負の相関関係を有しており、骨折又は骨粗鬆症の予防或いは治療用組成物及び骨折または骨粗鬆症の発生危険を予測するためのバイオマーカーとして有用に用いられることができる。

【図面の簡単な説明】

10

【 0 0 2 5 】

【図 1】図 1 は、カップリング現象を調査するための試験管内システムを確立するために、破骨細胞の生成及び骨吸収に対する可変の培養条件を準備する図である。{ はこつさいぼう }

【図 2】図 2 は、初期の破骨細胞の生成から誘導された因子による前骨芽細胞の補充の刺激が骨 - 再形成部位でカップリング現象の主要なメカニズムであることを説明する図である。

【図 3 a】図 3 a は、分化した破骨細胞での s l i t 3 の分泌を示す図である。

【図 3 b】図 3 b は、R A N K L により分化した破骨細胞での s l i t 3 の発現が N F A T c 1 s i R N A の前処置により抑制されることを示す図である。

20

【図 4 a】図 4 a は、s l i t 3 の濃度に応じて骨芽細胞の移動が増加することを示す図である。

【図 4 b】図 4 b は、s l i t 3 の濃度に応じて骨芽細胞の生存能が増加することを示す図である。

【図 4 c】図 4 c は、s l i t 3 の濃度に応じて骨芽細胞の増殖が増加することを示す図である。

【図 4 d】図 4 d は、s l i t 3 により骨芽細胞の分化マーカーである A L P 及び O C N の発現が増加することを示す図である。

【図 4 e】図 4 e は、s l i t 3 により骨芽細胞内で O P G の生産が促進されることを示す図である。

30

【図 4 f】図 4 f は、s l i t 3 により骨芽細胞でラメリポディアが観察されることを示す図である。

【図 5】図 5 は、動物モデルで s l i t 3 の注入により骨形成が増加することを示す図である。

【図 6】図 6 は、動物モデルで s l i t 3 の処理により骨損失が抑制されることを示す図である。

【図 7】図 7 は、s l i t 3 により骨形成の表面に骨芽細胞の移動が増加することを説明した図である。

【図 8 a】図 8 a は、s l i t 3 ノックアウトマウスの胚を V o n K o s s a 染色を介して観察した図である。

40

【図 8 b】図 8 b は、s l i t 3 ノックアウトマウスの胚を V E G F 免疫組織化学染色を介して観察した図である。

【図 9】図 9 は、骨細胞で s l i t 3 の作用が r o b o 1、r o b o 2 または r o b o 3 受容体を介して媒介されることを説明する図である。

【図 10】図 10 は、R o b o 1 受容体を介した s l i t の作用が骨細胞で v i l s e により媒介されることができるということを説明する図である。

【図 11】図 11 は、R o b o 1 - ノックアウトの動物モデルで骨密度が減少することを説明する図である。

【図 12】図 12 は、s l i t 1 及び s l i t 2 により破骨細胞の分化が減少することを説明する図である。

50

【図 13】図 13 は、LRR2 ドメインの組換えペプチドが破骨細胞の分化を抑制することを説明する図である。

【発明を実施するための形態】

【0026】

以下、本発明を詳しく説明する。

【0027】

本発明は、下記群から選択された遺伝子又はその発現タンパク質を有効成分として含有する骨折又は骨粗鬆症の予防或いは治療用薬学的組成物を提供する：

【0028】

配列番号 1 のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる *slit1* と、

10

【0029】

配列番号 2 のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる *slit2* と、

【0030】

配列番号 3 のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる *slit3* と、

【0031】

配列番号 4 のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる *robo1* と、

【0032】

配列番号 5 のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる *robo2* と、

【0033】

配列番号 6 のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる *vilse*。

20

【0034】

本発明の一実施例によると、前記 *slit1* タンパク質は配列番号 1 で表示され、前記 *slit2* タンパク質は配列番号 2 で表示され、前記 *slit3* タンパク質は配列番号 3 で表示され、前記 *robo1* タンパク質は配列番号 4 で表示され、前記 *robo2* タンパク質は配列番号 5 で表示され、前記 *vilse* タンパク質は配列番号 6 で表示されるアミノ酸配列を有するタンパク質、及び前記タンパク質の機能的同等物を含む。

【0035】

前記「機能的同等物」とは、アミノ酸の付加、置換または結実の結果、配列番号 1 乃至 6 で表示されるアミノ酸配列と少なくとも 70% 以上、好ましくは 80% 以上、より好ましくは 90% 以上、さらにより好ましくは 95% 以上の配列相同性を有するものであって、配列番号 1 乃至 6 で表示されるタンパク質と実質的に同質の生理活性を示すタンパク質を言う。

30

【0036】

本発明の *slit1*、*slit2*、*slit3*、*robo1*、*robo2* 又は *vilse* タンパク質は、その天然型アミノ酸配列を有するタンパク質だけでなく、そのアミノ酸配列の変異体もまた本発明の範囲に含まれる。*slit1*、*slit2*、*slit3*、*robo1*、*robo2* 又は *vilse* タンパク質の変異体とは、*slit1*、*slit2*、*slit3*、*robo1*、*robo2* 又は *vilse* の天然アミノ酸配列と一つ以上のアミノ酸残基が結実、挿入、非保全的または保全的置換或いはこれらの組み合わせにより相違する配列を有するタンパク質を意味する。分子の活性を全体的に変更させないタンパク質及びペプチドでのアミノ酸の交換は、当該分野に公知となっている (H. Neura th, R. L. Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979)。最も通常に生じる交換は、アミノ酸残基 Ala/Ser、Val/Ile、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Ser/Gly、Thy/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Asp/Asn、Leu/Ile、Leu/Val、Ala/Glu、Asp/Gly 間の交換である。場合によっては、リン酸化 (phosphorylation)、硫酸化 (sulfation)、アセチル化 (acetylation)、糖化 (glycosylation)、メチル化 (methylation)、ファルネシル化 (farnesylation) 等で修飾 (modification) されることもある。

40

50

【0037】

前記 *slit1*、*slit2*、*slit3*、*robo1*、*robo2* 又は *vilse* のタンパク質又はその変異体は、天然から抽出したり、合成 (Merrifield, J. Amer. chem. Soc. 85: 2149-2156, 1963) あるいは DNA 配列を基本とする遺伝子組換え方法により製造されることができる (Sambrook et al, Molecular Cloning, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, USA, 2版, 1989)。

【0038】

本発明の一実施例によると、前記 *slit1* 遺伝子は、配列番号 9 の塩基配列を有することができる。

10

【0039】

本発明の一実施例によると、前記 *slit12* 遺伝子は、配列番号 10 の塩基配列を有することができる。

【0040】

本発明の一実施例によると、前記 *slit3* 遺伝子は、配列番号 11 の塩基配列を有することができる。

【0041】

本発明の一実施例によると、前記 *robo1* 遺伝子は、配列番号 12 の塩基配列を有することができる。

20

【0042】

本発明の一実施例によると、前記 *robo2* 遺伝子は、配列番号 13 の塩基配列を有することができる。

【0043】

本発明の一実施例によると、前記 *vilse* 遺伝子は、配列番号 16 の塩基配列を有することができる。

【0044】

本発明の好ましい具現例において、前記 *slit1*、*slit2*、*slit3*、*robo1*、*robo2* 又は *vilse* は、タンパク質の形態だけでなく、遺伝子治療やワクチン等に使用されるために、細胞内で *slit1*、*slit2*、*slit3*、*robo1* 又は *robo2* 遺伝子を発現することができるベクターの形態で提供されることができる。

30

【0045】

前記発現ベクターは、前記 *slit1*、*slit2*、*slit3*、*robo1*、*robo2* 又は *vilse* 遺伝子を挿入して発現することができる当業界に公知となった発現ベクターを用いることができ、例えば、pBK-CMV (Staratagene)、pCR3.1 (Invitrogen) 等の発現ベクターを使用することができる。

【0046】

また、前記 *slit1*、*slit2*、*slit3*、*robo1*、*robo2* 又は *vilse* をコードする塩基配列、即ち、ポリヌクレオチドを含む組換え DNA 分子を、発現を調節する核酸配列に作動可能に連結した形態、例えば、発現ベクターの形態で治療対象の患者内でこれが発現するように前記ポリヌクレオチドを投与する。前記ベクターは、よって、コード配列を発現させることができるプロモーターの部位を含む適当な転写調節信号を含み、前記プロモーターは、治療される患者内で作動可能なものである。従って、ヒト遺伝子治療用であって、RNA ポリメラーゼを転写開始部位に導くのに必要な配列だけでなく、適当であれば、エンハンサーを含む他の作動配列又は調節配列を含む用語であるプロモーターは、好ましくはヒト遺伝子からのヒトプロモーター配列または一般的にヒトに発現する遺伝子からのヒトプロモーター配列、例えば、ヒトサイトメガロウイルス (CMV) からのプロモーターである。このような観点で、適当な公知となった真核プロモーターのうち、CMV、即ち初期のプロモーター、HSV チミジンキナーゼプロモーター、初期及び後期の SV40 プロモーター、ラウス肉腫ウイルス ("RSV") のようなレトロウ

40

50

イルスLTRプロモーター、及びマウスのメタロチオネイン - 1 プロモーターのようなメタロチオネインプロモーターが適合である。

【0047】

前記ポリヌクレオチド配列及び転写調節配列は、商業的に入手可能なpBR322のようなプラスミドに基づいて複製可能なプラスミドベクター内にクローニングされ提供されるか、又はよく知られている公開された手続きの日常的な応用により入手可能なプラスミドから構築されることもできる。

【0048】

前記ベクターはまた、前記遺伝子配列の3'に位置する転写調節配列、及びヒト治療に使用されるとき、SV40ウイルスのようなウイルスからの相応する配列のように治療される患者に認識可能なポリアデニル化配列を含むことができる。その他の転写調節配列がこの技術分野によく知られており、利用可能である。

10

【0049】

前記発現ベクターはまた、前記ベクターが伝播されることができるよう抗生剤の抵抗性のような選択可能なマーカーを含むことができる。

【0050】

それ自体で前記タンパク質を合成することができる発現ベクターを物理的方法で直接的に傷部位に導入させることができる。これらの例としては、例えば、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)のような製薬学的に許容される賦形剤中の溶液内に適当なベヒクル内の「ネイキッド」核酸ベクターを局部的に適用すること、または当業界に知られている方法によって、「遺伝子銃」の技術とも知られている粒子銃のような物理的方法でベクターを投与することを含む。

20

【0051】

前記「遺伝子銃」の技術は、米国特許番号第5371015号に記述された通り、推進装置からの高圧力下で放出させる方法であって、ベクターでコーティングされた金ビードのような不活性粒子を傷部位、例えば、皮膚細胞の表面を通過できる程度に十分な速力で加速するものである。

【0052】

また、DNAを直接受容体に投与するその他物理的方法としては、超音波、電氣的刺激、電気透過及びマイクロシーディング(microseeding)等がある。

30

【0053】

前記遺伝子配列はまた、形質転換された宿主細胞の手段として傷部位に投与されることができる。細胞は、患者から収集された細胞を含み、前記核酸配列をこの細胞内へ当業界に公知となっている遺伝子導入方法により導入し、形質転換された細胞を培養液中に成長させて患者に移植する。

【0054】

前記記述したような発現構造体を本発明の治療に多様な方法で使用できる。従って、前記発現構造体は、患者において治療が必要な部位に直接投与されることができる。

【0055】

本発明の別の具現例において、前記薬学的組成物は、slit1、slit2、slit3、robo1、robo2又はvlsseの発現を増加させる活性因子を有効成分として含むことができる。

40

【0056】

本発明において、「slit1、slit2、slit3、robo1、robo2又はvlsseの発現を増加させる活性因子」とは、slit1、slit2、slit3、robo1、robo2又はvlsseに直接または間接的に作用し、slit1、slit2、slit3、robo1、robo2又はvlsseの生物学的活性を改善、誘導、刺激、増加させる物質を意味する。前記物質は、有機又は無機化合物のような単一化合物、ペプチド、タンパク質、核酸、炭水化物及び脂質のような生体高分子化合物並びに複数化合物の複合体等を含む。前記slit3の発現を増加させる活性因子は、slit

50

t 3 の発現、活性、又は機能の減少により発病する疾病の予防、改善および治療に利用されることができる。前記物質が s l i t 1、s l i t 2、s l i t 3、r o b o 1、r o b o 2 又は v i l s e を活性化させるメカニズムは特に制限されない。例えば、前記物質は、転写、翻訳等の遺伝子発現を増大させたり、非活性型を活性型に転換させるメカニズムとして作用できる。好ましくは、s l i t 1、s l i t 2、s l i t 3、r o b o 1、r o b o 2 又は v i l s e を活性化させる物質は、ペプチド、タンパク質、核酸、炭水化物及び脂質のような生体高分子化合物である。核酸及びタンパク質の配列が既に公知となった s l i t 3 に対して、当業者は誘導剤または活性剤として作用する有機又は無機化合物のような単一化合物ペプチド、タンパク質、核酸、炭水化物及び脂質のような生体高分子化合物及び複数化合物の複合体等を当分野の技術を用いて製造またはスクリーニングで

10

【 0 0 5 7 】

本発明において、前記 s l i t 3 は分化した破骨細胞から分泌され、骨芽細胞で移動、生存能、増殖、分化及び O P G の生産を増加させる機能を行い、骨形成を増加させて、骨損失を抑制し、血管形成 (a n g i o g e n e s i s) 及び骨形成に寄与する V E G F の発現を増加させるという優れた効果を有している。また、本発明による s l i t 3 の機能と活性の低下は、骨折又は骨粗鬆症の原因になり得る。これによって、前記遺伝子の機能を正常化、活性化させるための遺伝子又はタンパク質の処置は、骨折及び骨粗鬆症の治療的接近のための重要な観点になることができる。

【 0 0 5 8 】

20

従って、前記薬学的組成物は、前記遺伝子を含む発現ベクター又はその発現ベクターを含む宿主細胞を増殖及び活性化させて患者に投与し、骨折又は骨粗鬆症を治療又は予防することができる。前記遺伝子又はその発現タンパク質によって破骨細胞の分化を抑制させ、骨芽細胞の分化、増殖、移動を促進させて、骨折又は骨粗鬆症を治療することができる。

【 0 0 5 9 】

本発明の薬学的組成物は、その製造において通常使用する適切な担体、賦形剤及び希釈剤をさらに含むことができる。また、通常の方法に従って、散剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、懸濁液、エマルジョン、シロップ、エアゾール等の経口型剤形、外用剤、座剤及び滅菌注射溶液の形態で剤形化して使用されることができる。当該技術分野に知られている適切な製剤は、文献 (R e m i n g t o n ' s P h a r m a c e u t i c a l S c i e n c e、最近、M a c k P u b l i s h i n g C o m p a n y , E a s t o n P A) に開示されているものを使用することが好ましい。含まれ得る担体、賦形剤及び希釈剤としては、ラクトース、デキストロース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、キシリトール、エリスリトール、マルチトール、でん粉、アカシアゴム、アルジネート、ゼラチン、リン酸カルシウム、ケイ酸カルシウム、セルロース、メチルセルロース、微晶質セルロース、ポリビニルピロリドン、水、メチルヒドロキシ安息香酸、プロピルヒドロキシ安息香酸、タルク、ステアリン酸マグネシウム及び鉱物油等がある。前記組成物を製剤化する場合は、普通使用する充填剤、増量剤、結合剤、湿潤剤、崩壊剤、界面活性剤等の希釈剤又は賦形剤を使用して調剤される。経口投与のための固形製剤には、錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤等が含まれ、このような固形製剤は、前記組成物に少なくとも一つ以上の賦形剤、例えば、でん粉、炭酸カルシウム (c a l c i u m c a r b o n a t e)、スクロース、ラクトース、ゼラチン等を混ぜて調剤される。また、単純な賦形剤以外にステアリン酸マグネシウム、タルクのような潤滑剤も使用される。経口のための液状製剤としては、懸濁剤、内用液剤、乳剤、シロップ剤等が該当するが、通常使用される単純希釈剤である水、流動パラフィン以外に様々な賦形剤、例えば、湿潤剤、甘味剤、芳香剤、保存剤等が含まれることができる。非経口投与のための製剤には、滅菌した水溶液、非水性溶剤、懸濁剤、乳剤、凍結乾燥製剤、座剤が含まれる。非水性溶剤、懸濁剤としては、プロピレングリコール (p r o p y l e n e g l y c o l)、ポリエチレングリコール、オリーブオイルのような植物性油、オレイン酸エチルのような注射可能なエステル等が使用されることができる。座剤の基剤としては、ウィテップゾール (w i t e

30

40

50

p s o l)、マクロゴール、ツイン (t w e e n) 6 1、カカオ脂、ラウリン脂、グリセロゼラチン等が使用されることができる。

【 0 0 6 0 】

本発明で使用される用語「投与」は、任意の適切な方法で個体に所定の本発明の組成物を提供することを意味する。

【 0 0 6 1 】

本発明の薬学的組成物の好ましい投与量は、患者の状態及び体重、疾病の程度、薬物形態、投与経路及び期間に応じて異なるが、当業者により適宜選択されることができる。好ましい効果のために、本発明の組成物は、1日0.001mg/kg乃至10000mg/kgの量で投与することができる。前記組成物の投与は、1日に一度投与してもよく、数回分けて投与してもよい。

10

【 0 0 6 2 】

本発明の薬学的組成物は、個体に多様な経路で投与されることができる。投与のすべての方式は予想できるが、例えば、経口、直腸又は静脈、筋肉、皮下、子宮内の硬膜または脳血管内 (i n t r a c e r e b r o v e n t r i c u l a r) への注射によって投与されることができる。

【 0 0 6 3 】

本発明の組成物は、骨折又は骨粗鬆症の予防及び治療のために、単独で、又は手術、放射線治療、ホルモン治療、化学治療及び生物学的反応調節剤を使用する方法と併用して使用することができる。

20

【 0 0 6 4 】

また、本発明は、s l i t 1、s l i t 2、s l i t 3、r o b o 1、r o b o 2及びv i l s eで構成された群から選択されたタンパク質を有効成分として含有する骨折又は骨粗鬆症の予防または改善用食品組成物を提供する。

【 0 0 6 5 】

本発明において、前記「骨折又は骨粗鬆症の予防または改善用食品組成物」は、疾病の予防及び改善、生体防御、免疫、病後の回復、老化抑制等生体調節機能を有する食品を言うものであって、長期的に服用したとき、人体に無害しなければならない。

【 0 0 6 6 】

本発明の組成物は、骨折又は骨粗鬆症の予防あるいは改善を目的として健康機能食品に添加されることができる。本発明のタンパク質またはその発現を増加させる活性因子を食品添加物に使用する場合、前記成分をそのまま添加したり、他の食品又は食品成分と共に使用されることができ、通常の方法によって適宜使用されることができる。有効成分の混合量は、使用目的（予防、健康または治療的処置）に応じて適合に決定されることができる。一般的に、食品または飲料の製造時に、本発明のタンパク質またはその発現を増加させる活性因子は、原料に対して15重量%以下、好ましくは10重量%以下の量で添加される。しかし、健康及び衛生を目的としたり、または健康調節を目的とする長期間の摂取の場合には、前記範囲以下であり得、安全性の面において何ら問題がないため、有効成分は前記範囲以上の量でも使用されることができる。

30

【 0 0 6 7 】

前記食品の種類には特に制限はない。前記物質を添加することができる食品の例としては、肉類、ソーセージ、パン、チョコレート、キャンデー類、スナック類、菓子類、ピザ、ラーメン、その他麺類、ガム類、アイスクリーム類を含む酪農製品、各種スープ、飲料水、お茶、ドリンク剤、アルコール飲料及びビタミン複合剤等があり、通常の意味での健康食品を全て含む。

40

【 0 0 6 8 】

本発明の健康飲料組成物は、通常の飲料のように様々な香味剤または天然炭水化物等を追加成分として含むことができる。前述した天然炭水化物は、ブドウ糖、果糖のようなモノサッカライド、マルトース、スクロースのようなジサッカライド、及びデキストリン、シクロデキストリンのような天然甘味剤や、サッカリン、アスパルテームのような合成甘

50

味剤等を使用することができる。前記天然炭水化物の割合は、本発明の組成物 100 ml 当たり、一般的に約 0.01 乃至 10 g、好ましくは約 0.01 乃至 0.1 g である。

【0069】

前記以外に、本発明の組成物は、様々な栄養剤、ビタミン、電解質、風味剤、着色剤、ペクチン酸及びその塩、アルギン酸及びその塩、有機酸、保護性コロイド増粘剤、pH 調節剤、安定化剤、防腐剤、グリセリン、アルコール、炭酸飲料に使用される炭酸化剤等を含むことができる。その他に、本発明の組成物は、天然果物ジュース、果物ジュース飲料及び野菜飲料の製造のための果肉を含むことができる。このような成分は、独立または組み合わせで使用することができる。このような添加剤の割合は大きく重要ではないが、本発明の組成物 100 重量部当たり 0.01 乃至 0.1 重量部の範囲で選択されることが一般的である。

10

【0070】

また、本発明は、s l i t 1、s l i t 2、s l i t 3、r o b o 1、r o b o 2 及び v i l s e で構成された群から選択されたタンパク質を含む骨折又は骨粗鬆症の発生予測用マーカー組成物を提供する。

【0071】

本発明の具現例において、骨粗鬆症の可能性のある患者を対象に骨粗鬆症の発病率と s l i t 3 タンパク質との相関関係に対して、患者の血液から得た s l i t 3 タンパク質のプロテオームを分析し、骨粗鬆症の発病率が高いグループで血中 s l i t 3 タンパク質の濃度が特徴的に発現が減少するということを明らかにし、骨折又は骨粗鬆症の診断または治療に使用されることができるタンパク質性マーカーとして s l i t 3 を選択した。

20

【0072】

本発明の s l i t 3 タンパク質は、骨粗鬆症の発病率と負の相関関係を有しており、骨折又は骨粗鬆症の発生危険を予測するためのバイオマーカーとして有用に利用されることができる。

【0073】

本発明に使用された用語、「プロテオーム (p r o t e o m e) 」とは、遺伝体から作られることができる全てのタンパク質の総体を意味するが、これは、ある細胞または組織で特異的な生理状態や病理状態に応じてプロテオームの様相が常に変化することになる動的な概念である。プロテオミクス (p r o t e o m i c s) は、このようなプロテオームを研究する方法と技術を包括して指称するものであって、タンパク質の性質を遺伝子の発現、翻訳後変形 (p o s t - t r a n s l a t i o n a l m o d i f i c a t i o n) 、他のタンパク質との結合に焦点を置いて研究することによって、細胞内の変形過程とネットワークの形成を疾病の進行過程と連係させて、総体的に理解しようとする研究分野を意味する。このようにプロテオームは、ある細胞または組織での生理状態や病理状態を代弁するので、疾病の診断に直接使用されることができる診断のマーカーを探す方法としては最も適合なものである。また、骨折または骨粗鬆症のような場合、特定遺伝子の発現が疾病の進行程度に関与し、骨折又は骨粗鬆症を促進することが確認されれば、そのタンパク質の存在を確認及び同定し、骨折又は骨粗鬆症の診断あるいは治療剤の開発の標的タンパク質にすることもできる。ゲノミクス (G e n o m i c s) の優れた敏感度と遺伝子の容易な増幅等のメリットで、これを用いた診断及び治療剤の開発やはり多く行われているが、DNA や mRNA 段階での変化が、実際に細胞内で活性を有するタンパク質の変化にすぐに連結されないこともあるという点で、理論上の問題点が残っており、さらに現実的には、遺伝物質がない体液の場合、プロテオミクスが唯一の研究方法である。現在、非 - 侵襲的 { しんしゅう てき } アプローチ (n o n - i n v a s i v e a p p r o a c h) として診断に使われているものは、血漿、血清、尿、脳脊髄液、羊水、分泌液等の体液であるが、多くの研究者が診断マーカーとして疾病の特異的なタンパク質を発掘するために、プロテオミクス方法を導入している。

30

40

【0074】

本明細書において、「骨折又は骨粗鬆症の発生予測用マーカー」は、骨粗鬆症の発病率

50

が高いグループと低いグループの血液試料を区分する基準になるタンパク質性物質を指称する。本発明において、このタンパク質性マーカーは、骨粗鬆症の発病率が高いグループと低いグループの血液での存在量が相対的に特徴的に多かったり少ない。

【0075】

本発明は、骨粗鬆症の発病率が高いグループと低いグループの血液からプロテオームを分析したものであるため、このように確認されたタンパク質性マーカーは、骨粗鬆症の発病に対して特異的であるといえ、従って、骨折又は骨粗鬆症の診断に有用に使用されることができる。さらに、このように確認されたタンパク質性マーカーが、骨粗鬆症の発病率が高いグループで変化様相が著しいという点を勘案すると、このタンパク質性マーカーの生理学的機能は、骨粗鬆症の発病に直接的に関係されたものである可能性があり、従って、このタンパク質性マーカーは、骨粗鬆症の発病のメカニズムを研究したり、骨粗鬆症の治療の開発のための標的タンパク質としても有用に使用されることができる。

10

【0076】

また、本発明は、s l i t 1、s l i t 2、s l i t 3、r o b o 1、r o b o 2及びv i l s eで構成された群から選択されたタンパク質またはその免疫原性断片に特異的に結合する抗体を含む骨折又は骨粗鬆症の発生予測用キットを提供する。

【0077】

本発明において、抗体とは抗原性部位に対して指示される特異的なタンパク質分子を意味する。本発明の目的上、抗体はマーカータンパク質に対して特異的に結合する抗体を意味し、多クローン抗体、単クローン抗体及び組換え抗体を全て含む。

20

【0078】

前記した通り、骨折又は骨粗鬆症の発生危険予測用マーカータンパク質が糾明されたため、これを用いて抗体を生成することは、当業界に広く公知となった技術を用いて容易に製造できる。

【0079】

多クローン抗体は、前記した骨折又は骨粗鬆症の発生危険予測用マーカータンパク質の抗原を動物に注射し、動物から採血して、抗体を含む血清を収得する当業界に広く公知となった方法によって生産することができる。このような多クローン抗体は、ヤギ、ウサギ、羊、猿、馬、豚、牛、犬等の任意の動物種宿主から製造可能である。

【0080】

単クローン抗体は、当業界に広く公知となったハイブリドーマ方法(hybridoma method)(Kohler及びMilstein(1976)European Journal of Immunology 6:511-519参照)、又はファージ抗体ライブラリ(Clackson et al, Nature, 352:624-628, 1991; Marks et al, J.Mol.Biol., 222:58, 1-597, 1991)技術を用いて製造されることができる。前記方法で製造された抗体は、ゲル電気泳動、透析、塩沈殿、イオン交換クロマトグラフィ、環境にやさしいクロマトグラフィ等の方法を用いて分離、精製することができる。

30

【0081】

本発明の抗体は、2つの全長の軽鎖及び2つの全長の重鎖を有する完全な形態だけでなく、抗体分子の機能的な断片を含む。抗体分子の機能的な断片とは、少なくとも抗原結合機能を保有している断片を意味し、F a b、F (a b ')、F (a b ') 2及びF v等がある。

40

【0082】

本発明のキットは、分析方法に適合な一つの種類またはそれ以上の他の構成成分組成物、溶液または装置で構成される。

【0083】

例えば、本発明のキットは、E L I S Aを行うために必要な必須要素を含むことを特徴とするキットであり得る。前記E L I S Aキットは、マーカータンパク質に対する特異的な抗体を含み、前記タンパク質の水準を測定する製材を含む。前記E L I S Aキットは、

50

「抗原 - 抗体複合体」を形成した抗体を検出することができる試薬、例えば、標識された2次抗体、発色団 (chromophores)、酵素 (例: 抗体と接合) 及びその基質を含むことができる。また、定量対照区のタンパク質に特異的な抗体を含むことができる。

【0084】

また、本発明のキットは、PCRを行うために分析しようとする試料から由来したゲノムDNA、本発明のマーカーに対して特異的なプライマセット、適量のDNA重合酵素 (例えば、Taq polymerase)、dNTP混合物、PCR緩衝溶液及び水を含むキットであり得る。前記PCR緩衝溶液は、KCl、Tris-HCl及びMgCl₂を含有することができる。これ以外に、PCR産物の増幅可否を確認することができる電気泳動を行うのに必要な構成成分が、本発明のキットにさらに含まれることができる。

10

【0085】

また、本発明のキットは、RT-PCRを行うために必要な必須要素を含むキットであり得る。RT-PCRキットは、マーカー遺伝子に対する特異的な各々のプライマ対以外にも、テストチューブまたは他の適切なコンテナ、反応緩衝液 (pH及びマグネシウム濃度は多様)、デオキシヌクレオチド (dNTPs)、Taq-ポリメラーゼ及び逆転写酵素のような酵素、DNase、RNase抑制剤、DEPC-水 (DEPC-water)、滅菌水等を含むことができる。また、定量対照区として使用される遺伝子に特異的なプライマ対を含むことができる。

【0086】

また、本発明のキットは、DNAチップを行うために必要な必須要素を含むキットであり得る。DNAチップのキットは、遺伝子またはその断片に該当するcDNAがプローブに付着されている基板を含み、基板は、定量構造の遺伝子またはその断片に該当するcDNAを含むことができる。

20

【0087】

また、本発明のキットは、本発明のマーカーが固定化されている基板を有するマイクロアレイの形態であり得る。

【0088】

また、本発明は、骨折又は骨粗鬆症の発生予測に必要な情報を提供するために、患者の血液試料から抗原 - 抗体反応を通じ、slit1、slit2、slit3、robo1、robo2及びvilsで構成された群から選択されたタンパク質を検出する方法を提供する。

30

【0089】

本発明において、「タンパク質の検出」は、mRNA又はタンパク質の発現の水準を測定することによって確認することができる。

【0090】

前記「mRNA発現の水準の測定」は、骨折又は骨粗鬆症の発生危険を予測するために、生物学的試料で前記タンパク質を暗号化するmRNAの存在可否と、発現の程度を確認する過程で、mRNAの量を測定する。このための分析方法としては、当業界に公知となった方法を利用することができ、例えば、重合酵素反応 (PCR)、逆転写重合酵素反応 (RT-PCR)、競争的逆転写重合酵素反応 (Competitive RT-PCR)、リアルタイム逆転写重合酵素反応 (Realtime RT-PCR)、RNase保護分析法 (RPA; RNase protection assay)、ノーザンブロットティング (Northern blotting)、DNAチップ等があるが、これに制限されるわけではない。

40

【0091】

本発明において、「タンパク質発現の水準の測定」は、骨折又は骨粗鬆症の発生危険を予測するために生物学的試料でタンパク質の存在可否と発現の程度を確認する過程であって、好ましくは、前記遺伝子のタンパク質に対して特異的に結合する抗体を用いてタンパク質の量を確認することができる。このための分析方法としては、当業界に公知となった方法を利用することができ、例えば、ウェスタンブロット、ELISA (enzyme

50

linked immunosorbent assay, ELISA)、放射線免疫分析(RIA:Radioimmunoassay)、放射免疫拡散法(radio immunodiffusion)、オクテロニー(Ouchterlony)免疫拡散法、ロケット(rocket)免疫電気冷凍、組織免疫染色、免疫沈降分析法(Immunoprecipitation Assay)、補体固定分析法(Complement Fixation Assay)、流式細胞分析(Fluorescence Activated Cell Sorter、FACS)、タンパク質チップ(protein chip)等があるが、これに制限されるわけではない。

【0092】

本発明の好ましい具現例によると、前記slit3は骨粗鬆症の発病率と負の相関関係を有しており、骨折又は骨粗鬆症の発生危険を予測するためのバイオマーカーとして有用に利用されることができる。

10

【0093】

また、本発明は、(a)slit1、slit2、slit3、robo1、robo2及びvillseで構成された群から選択された遺伝子が導入された細胞を培養する段階と、(b)被検物質を前記(a)段階の細胞と接触させる段階と、(c)前記(b)段階の細胞で、slit1、slit2、slit3、robo1、robo2またはvillseタンパク質の発現の水準を、被検物質を処理しない対照群と比較する段階とを含む骨折又は骨粗鬆症治療剤のスクリーニング方法を提供する。

【0094】

20

また、本発明は、配列番号17のアミノ酸配列で表示され、slit3タンパク質のLRR2ドメインの組換えペプチド、及びこれを含む骨折又は骨粗鬆症の予防或いは治療薬学的組成物を提供する。

【0095】

前記slit3タンパク質のLRR2ドメインは、slitタンパク質にある四つのleucine-rich repeat(LRR)ドメインの一つであって、このうち第二のドメインであるLRR2が受容体と結合する。本発明者は、LRR2ドメインとしてslit3の小さい組換えペプチドを製造した後、これを用いて破骨細胞の分化に対する効果を確認した結果、前記組換えペプチドは、破骨細胞の分化を顕著に抑制することが確認された(図13)。従って、前記組換えペプチドは骨粗鬆症の治療に有用に使用されることができ

30

【0096】

また、本発明は、下記群から選択されたSNP位置の塩基を含む10つ以上の連続塩基で構成される骨折又は骨粗鬆症の発生予測用ポリヌクレオチドまたはその相補的ポリヌクレオチドを提供する:

【0097】

配列番号10の塩基配列からなるポリヌクレオチドのNCBI refSNP ID: rs7655084;

【0098】

配列番号11の塩基配列からなるポリヌクレオチドのNCBI refSNP ID: rs1549909;

40

【0099】

配列番号11の塩基配列からなるポリヌクレオチドのNCBI refSNP ID: rs10036727;

【0100】

配列番号13の塩基配列からなるポリヌクレオチドのNCBI refSNP ID: rs3821735;

【0101】

配列番号13の塩基配列からなるポリヌクレオチドのNCBI refSNP ID: rs78817248;及び

50

【0102】

配列番号15の塩基配列からなるポリヌクレオチドのNCBI refSNP ID: rs12418548。

【0103】

前記SNPに対するNCBIのrefSNP IDは、前記SNPの配列及びその位置を示すものである。当業者であれば、前記番号を用いてSNPの位置及び配列を容易に確認することができる。分析に使用されたreference配列は、Genome Reference Consortiumで2009年2月に収集され公開された配列であり、NCBI assembly databaseのGRCh37(hg19)(<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>)で詳しい内容を確認することができる。NCBIに登録されているSNPのrefSNP IDに該当する具体的な配列は、続けられる遺伝子に対する研究結果に応じて少しずつ変更されることがあり、このような変更された配列もまた、本発明の範囲内に含まれることは当業者に自明であろう。

10

【0104】

本発明の実施例によると、前記RefSNP ID:rs7655084の場合は、SLIT2遺伝子の第4染色体20255306位置の塩基で骨密度が低く示される遺伝子型は、TからGで置換された。RefSNP ID:rs1549909の場合には、SLIT3遺伝子の第5染色体168180670位置の塩基で骨密度が低く示される遺伝子型は、CからTで置換された。RefSNP ID:rs10036727の場合には、SLIT3遺伝子の第5染色体168180081位置の塩基で骨密度が低く示される遺伝子型は、CからTで置換された。RefSNP ID:rs3821735の場合には、ROBO2遺伝子の第3染色体77684222位置の塩基で骨密度が低く示される遺伝子型は、CからAで置換された。RefSNP ID:rs78817248の場合には、ROBO2遺伝子の第3染色体77626788位置の塩基で骨密度が低く示される遺伝子型は、CからGで置換された。RefSNP ID:rs12418548の場合には、ROBO4遺伝子の第11染色体124757560位置の塩基で骨密度が低く示される遺伝子型は、AからGで置換された。

20

【0105】

下記実施例から確認できるように、骨密度(BMD)が平均以上であるグループと、極めて低いBMDグループを対象に前記遺伝子に存在する遺伝子多型を研究した結果、前記遺伝子のSNP位置の対立遺伝子は、極めて低いBMD状態の危険性と有意に関連があった(表6参照)。具体的に、低いBMD状態の危険を示すSNP位置で遺伝子型はrefSNP ID:rs7655084の場合はGT、GG遺伝子型であり;refSNP ID:rs1549909の場合はTT遺伝子型であり;refSNP ID:rs10036727の場合はTT遺伝子型であり;refSNP ID:rs3821735の場合はCC、CT遺伝子型であり;refSNP ID:rs78817248の場合はCG、GG遺伝子型であり;refSNP ID:rs12418548の場合はGG、GA遺伝子型で示された。

30

【0106】

従って、本発明の前記SNPは極めて低い骨密度による骨折又は骨粗鬆症の発生予測のために有用に使用されることができる。

40

【0107】

本発明において、前記SNPを含むポリヌクレオチドまたはその相補的ポリヌクレオチドは10つ以上の連続された塩基で構成されたDNA断片であり得、DNA断片の大きさは全体遺伝子のfull lengthではない一つのSNP部位の塩基を含むどんな大きさの断片でも構わないが、好ましくは10乃至数百塩基であることを特徴とし、さらに好ましくは100-500個の塩基が適当である。100-500個塩基の場合は、前記SNPを探知するためのプローブ乃至はプライマで用いることができ、それ以上の塩基の場合は、PCR-RFLP等に用いられることができる。

50

【0108】

また、本発明は、前記SNPを含むポリヌクレオチドまたはその相補的ポリヌクレオチドを含む骨折又は骨粗鬆症の発生予測用マーカー組成物、或いは予測用キットを提供する。

【0109】

本発明において、前記SNPを含むキットは、当業界に公知となったSNPキットの製造方法を通じて具現されることができる。例えば、前記キットがマイクロアレイで具現される場合、例えば、SNPを含むポリヌクレオチドまたはその相補的ポリヌクレオチドを基板上に固定させ、核酸の混成化及び混成化結果の検出を介して、SNPを容易に検出することができる。

10

【0110】

前記SNPを含むポリヌクレオチドまたはその相補的ポリヌクレオチドを基板上に固定させることは、当業界に知られている方法であって、容易に行われることができる。また、マイクロアレイ上での核酸混成化及び混成化結果の検出方法もまた、当業界に知られている方法の通りに行われることができる。例えば、核酸試料を検出可能な信号を発生させる標識物質（例えば、蛍光物質）で標識した後、マイクロアレイ上に混成化し、前記標識物質から発生する信号を検出することによって混成化結果を検出することができる。

【0111】

以下、実施例を通じて本発明をさらに詳しく説明しようとする。これらの実施例は、ひたすら本発明を例示するためのものであって、本発明の範囲がこれらの実施例により制限

20

【実施例】

【0112】

材料及び試薬

【0113】

NFATc1に対する抗体は、Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) から購入した。slit3に対する抗体及び組換えslit1/2/3は、それぞれAbcam (Cambridge, MA, USA) 及びR&D System Inc. (Minneapolis, MN, USA) から購入した。Robo1及びRobo2 f cキメラは、R&D System Inc. から購

30

【0114】

実施方法1. 細胞培養、器官培養及び条件培地の収集

【0115】

一次マウス骨髄細胞(BMCs)は、5-6週齢のC57BL/6マウスの大腿骨(femur)及び脛骨(tibia)をフラッシング(flushing)することによって得た後、5%CO₂で加湿された条件で、10%ウシ胎児血清(FBS; Gibco, Grand Island, NY, USA)、100U/mLペニシリン、及び100µg/mLストレプトマイシンを含む最小の必須培地(-MEM; Wel Gene, Daegu, Korea)で、37℃で培養した。培養の24時間後、非付着細胞(nonaherent cells)を収集して48-ウェルプレートで1.0×10⁵細胞/ウェルの密度で培養した。3日以上30ng/mL M-CSF(R&D System Inc.)で培養したBMCsを骨髄大食細胞(bone marrow macrophages, BMMs)として使用した。この段階の細胞を破骨細胞前駆体(osteoclast precursors)と見なした。BMCsは毎2-3日毎に交換された培養培地を用いて、30ng/mL M-CSF及び50ng/mLの可溶性(soluble)RANKL(R&D System Inc.)で培養することによって、破骨細胞に分化を誘導した。他の方法として、マウス(murine)の大食細胞Raw264.7細胞(ATCC, Manassas, VA, USA)もまた同じ容量のRANKLを使用し、破骨細胞-類似細胞の製造に使用された。

40

50

【0116】

ヒト破骨細胞を用いた共免疫沈降 (co-immunoprecipitation) 実験のために、末梢血液を普通の健康な支援者から入手した。血液を同量の α -MEM で希釈した後、末梢血液単球 (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) を Lymphoprep™ (Axis-Shield, Oslo, Norway) 密度勾配上の遠心分離によって分離した。前記細胞を auto Macs buffer で懸濁し、CD14-陽性単球を細胞分離機 (auto Macs magnetic cell separator; Miltenyi Biotec h, Auburn, CA, USA) を用いて選別した。PBMCs ($3.0 - 4.0 \times 10^6$ /well) を M-CSF (25 ng/mL) がある状態で3日間6ウェルプレートで培養した後、M-CSF (25 ng/mL) 及び RANKL (30 ng/mL) で追加培養した。細胞が破骨細胞として完全に分化するには7-9日がかかる。

10

【0117】

新生の C57BL/6 マウスから得た頭蓋冠 (calvaria) のシーケンシャルコラゲナーゼ消化 (sequential collagenase digestion) で一次マウスの破骨細胞を分離し、10% FBS を含む α -MEM で維持した。マウス MC3T3-E1 前骨芽細胞株 (preosteoblast cell line, ATCC) を 5% CO₂ で加湿された条件で、10% FBS、100 U/mL ペニシリン、及び 100 $\mu\text{g/mL}$ ストレプトマイシンを含む α -MEM で 37℃ で培養した。前記培地は、週2回交換した。80% コンフルエンスまで成長させ、前記細胞を trypsin-EDTA (Gibco) を用いて継代培養した。ヒト骨芽細胞を用いた共免疫沈降実験のために、一次ヒト骨髓間質細胞 (bone marrow stromal cells, BMSCs) を肋骨 (ribs) から分離した。肋骨は、代謝性骨疾患のない患者の開胸術 (thoracotomy) 時に開く。前記肋骨は、無菌状態で切除し、軟組織をきれいにした後縦方向に (longitudinally) 開いた。露出された骨髓を無血清 α -MEM で何回の洗浄を用いてフラッシュアウトし、1,400 rpm で10分間遠心分離した。細胞ペレットを培養培地で再懸濁し、ヒト BMSC の分画を Lymphoprep™ (Axis-Shield, Oslo, Norway) で得た。前記細胞を 75-cm² のプラスチック培養フラスコに 3×10^7 細胞/75-cm² 密度でシーディングし、10% FBS、100 U/mL のペニシリン、及び 100 $\mu\text{g/mL}$ のストレプトマイシンを含む α -MEM で培養した。培地は2週間後から週2回交換した。前記細胞が 80-90% のコンフルエンスに成長すると、0.01% トリプシン及び 0.05% EDTA を用いて継代培養した。第2継代培養の細胞を実験に使用した。

20

30

【0118】

6週齢の C57BL/6 マウスから得た大腿骨の器官培養を行った。前記骨髓を強くフラッシングし、細胞を H₂O で24時間振盪培養してさらに除去した。その後、前記骨は、 α -MEM で広く洗浄し、BMMs と共同培養した。

【0119】

破骨細胞生成 (osteoclastogenesis) 又は骨吸収 (bone resorption) の間 CM は指示された日付に24時間収集した。確保した CM は、0.45- μm メンブレンフィルターでろ過し、使用時まで -70℃ で保管した。

40

【0120】

実験方法2. CMで破骨細胞の形成及び吸収活性の測定

【0121】

破骨細胞生成の多様な段階で収集された CM で破骨細胞形成の程度は、0.2 U/L 低い検出限界値を有する商業的に入手可能な ELISA キット (Immunodiagnostic Systems, Boldon, UK) を用いて製造会社の説明書に従って TRAP-5b (tartrate-resistant acid phosphatase-5b) を測定することによって評価した。CMでの吸収活性は、2.0 ng/mL の低い検出限界値を有する ELISA kit (RatLaps; Immunodiagnostic Systems, Boldon, UK) を用いて測定した。

50

stic Systems) を用いて CTX (C - t e l o p e p t i d e) を測定することによって評価した。

【 0 1 2 2 】

実験方法 3 . 走化性及び傷治癒の分析

【 0 1 2 3 】

走化性 (c h e m o t a x i s) の分析は、8 - μ m ポアーを含むポリカーボネートメンブレンのあるトランスウェルを用いて、Boyden chamber system で行った (Costar, Corning, NY, USA)。細胞を 0.1 % FBS があ
る - MEM 100 μ L 当たり 1.0×10^5 細胞の密度で 6 時間インナーチャンバにシ
ーディングした後、さらに 24 時間アウターチャンバで CM または s l i t 3 で処理した
。上部のメンブレン上の細胞、綿棒で磨いて完全に除去した。下部のメンブレンに侵入し
た細胞を固定し、ヘマトキシリンを固定し、ヘマトキシリンで染色した。最後に、前記細
胞をコンピュータビデオ - イメージングシステム (Olympus, Tokyo, Jap
an) を用いてカウントした。

10

【 0 1 2 4 】

傷 - 治癒の分析のために、コンフルエント細胞をプラスチックチップを用いて傷が付く
ようにした。細胞移動 (c e l l m i g r a t i o n) が 0.1 % FBS が添加された
- MEM で生じた後、傷を表示し、0 時間及び 24 時間時点で倒立顕微鏡を用いて測定
した。定量は Quantity One (BioRad, Hercules, CA, US
A) を用いて、各傷縫合 (wound closure) 領域を測定することによって行
った。データは、傷縫合のパーセントで表示した。

20

【 0 1 2 5 】

実験方法 4 . 細胞生存力及び分化の測定

【 0 1 2 6 】

細胞生存力は、製造会社の説明書に従ってセルカウティングキット - 8 (CCK - 8 ;
Dojindo, Kumamoto, Japan) を用いて測定した。簡単に説明すると
、10 μ L の WST - 8 dye (2 - [2 - methoxy - 4 - nitrophenyl]
- 3 - [4 - nitrophenyl] - 5 - [2 , 4 - disulfophenyl]
- 2H - tetrazolium、monosodium salt) を 96 ウェルプレ
ートの各ウェルに添加して 2 時間反応させた後、450 nm で吸光度をマイクロプレート
リーダー (SPECTRAMax 340 PC; Molecular Devices, P
alo Alto, CA, USA) を用いて 650 nm の参照波長で測定した。

30

【 0 1 2 7 】

細胞分化は、Brd - U (5 - bromo - 2 ' - deoxyuridine) を用い
て測定した。骨芽細胞を 96 ウェルプレートにシーディングして 24 時間反応させた後、
- MEM で 24 時間継代培養した。続いて、前記細胞を 24 時間 Brd - U で反応させ
た後、細胞分化を Brd - U のラベリング及び検出キット (Roche, Mannheim
m, Germany) で測定した。

【 0 1 2 8 】

実験方法 5 . プロテオミクス・プロトコル

40

【 0 1 2 9 】

サンプル準備

【 0 1 3 0 】

Raw 264.7 細胞は、10 % FBS を含む - MEM を用いて 100 mm ディッシ
ュ当り 4.0×10^5 細胞の密度でシーディングした後、前記細胞を一日に可溶性 50 n
g / mL RANKL があつたりなかったりする状態で処理し、破骨細胞に分化させた。
翌日、前記細胞を無血清及びフェノールレッドがない培地で 3 回洗浄した後、培地を RA
NKL があつたりなかったりする、6 mL の無血清及びフェノールレッドがない - ME
M に交換し、一日間培養した。CM は 0.45 μ m のメンブレンフィルターでろ過して -
70 で保管した。CM にあるタンパク質は凍結乾燥して沈殿させた。

50

【0131】

C18可逆相HPLC及びトリプシン消化による分画

【0132】

タンパク質の複合体は、C18-HPLCカラム(214TP5125、2.1×150mm; Vydac Grace, Hesperia, CA, USA)、オート-サンプラー、及びUV検出器(215nm wavelength; Peptide Library Support Facility, Pohang, Korea)で構成されている毛細管HPLCシステムを用いて、0.3mL/minの流速で120分間0-60%勾配のACN(acetonitrile)及び0.1%TFA(trifluoroacetic acid)を用いて96分画に分離した。

10

【0133】

トリプシン消化(trypsin digestion)のために、各タンパク質分画を50mMABC(ammonium bicarbonate)に溶解させた後、10mM DTT(dithiothreitol)を添加してサンプルを還元させ、100mMのヨードアセトアミド(iodoacetamide)をシステインアルキル化のために添加した。最後に、500ngのトリプシンを添加し、37℃で6時間反応させた。

【0134】

LC-MS/MS分析

【0135】

それぞれの消化されたサンプルは、ナノフローHPLCシステムが備えられたLTQ(linear-trap quadrupole)質量分析器を用いて分析した(Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA)。ペプチドは、C18(3µm)がパッキングされた可逆相分析カラム(10cm×75µm i.d.)を用いて分離した。勾配は250nL/minuteの流速で5%ACNで5分間始め、以降60分間40%ACNで、最終10分間80%ACNで増加させた。溶離液(eluent)は1.8kVの電気噴射電圧でナノ-イオンソースを用いてLTQ質量分析器に注入した。前記分析法は、400-1500m/z範囲のフル質量分析(MS)のスキャンで構成され、5つの最も強いイオンに対するデータ-依存性質量分析(MS2)はフルMSスキャンで分析された。

20

【0136】

MASCOTデータベースの検索

【0137】

LTQ質量分析器から得たデータは国際タンパク質指数(IPI)のマウスFASTAのデータベース(version 3.54)及びMASCOT検索エンジンを用いて分析した。固定された変形としてトリプシン消化による不完全切断、メチオニンの酸化に対する可変的な変形、及びシステインのカルバミドメチル化(carbamidomethylation)を検索時に考慮した。本発明者は、信頼範囲95%の確率でそれぞれのイオンを評価した(P<0.05)。

30

【0138】

機能的注釈及び分泌性タンパク質の選別

【0139】

機能的注釈(functional annotation)のために、同定されたタンパク質は、ウェブベースのプログラム(<http://david.abcc.ncifcrf.gov>)である、DAVID(database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery)データベースを用いて、それらの生物学的過程及び分子機能によって分類した。また、同定されたタンパク質は、HMMスコアリング(SignalP 3.0 hidden Markov matrix scoring)を用いて、それらの分泌特性を明らかにするために評価した。

40

【0140】

50

実験方法 6 . ウエスタンブロット

【 0 1 4 1 】

細胞溶解物は溶解バッファ (2 0 m M Tris [pH 7.5]、1 5 0 m M NaCl、1 m M EDTA、1 % Triton X - 1 0 0、2.5 m M sodium pyrophosphate、1 m M - glycerophosphate、1 m M Na₃VO₄、1 m M NaF、及び a protease - inhibitor mixture) で 4 で 2 0 分間製造し、前記溶解物のタンパク質濃度はBCAタンパク質分析キット (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA) を用いて測定した。1 0 - 2 0 μ g のタンパク質を含むサンプルは、1 0 % ゲル SDS - PAGE に分離した後、ニトロセルロースメンブレン (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) に移した。TBST (5 0 0 m M Tris - HCL [pH 7.4]、1.5 M NaCl、0.1 % Tween - 2 0) に入っている 5 % スキムミルクで 1 時間室温でブロッキングした後、前記メンブレンを 1 次抗体で一晩反応させた後、2 次抗体で反応させた。免疫反応タンパク質は、増強化学発光キット (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) を用いて検出した。

10

【 0 1 4 2 】

実験方法 7 . 共免疫沈降法

【 0 1 4 3 】

GFP - tagged Robo1 及び Myc - tagged Vilse のヒト cDNA は Origene (Rockville, MD, USA) 社から購入した。Robo 1 - GFP 及び Vilse - Myc の cDNA を lipofectamine 2 0 0 0 (Gibco, Grand Island, NY, USA) でヒト BMSC 又はヒト PBM C に 6 時間トランスフェクションさせた後、細胞を Slit 3 で処理した。前記細胞はプロテアーゼ阻害剤混合物 (protease inhibitor cocktail; Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, USA) 及びホスファターゼ阻害剤 (phosphatase inhibitors; 1 m M Na₃VO₄、1 m M NaF) を含む TNE バッファ (2 5 m M Tris - HCL、pH 7.4、1 5 0 m M NaCl、1 % Triton X - 1 0 0、1 m M EDTA) で溶解させた。溶解物は 4 で 1 8 時間 GFP 抗体 (Anaspec, Fremont, CA, USA) 及びタンパク質 - G - セファロースビーズ (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) で免疫沈降させた。免疫沈降物及び細胞溶解物は、抗 - GFP または抗 - Myc 抗体 (Novus biological, Littleton, Co, USA) で免疫ブロット分析に提供された。

20

30

【 0 1 4 4 】

実験方法 8 . RT - PCR 及び定量的なリアルタイム PCR

【 0 1 4 5 】

全 RNA は、製造会社の説明書に従って TRIzol 試薬 (Invitrogen, Rockville, MD, USA) を用いて分離し、cDNA は Superscript III First - Strand Synthesis System (Invitrogen) を用いて 1 μ g の全 RNA から合成した。全ての PCR 増幅は Biometra thermocycler (GmbH, Goettingen, Germany) を用いて行った。各ターゲット遺伝子の mRNA 発現の水準は、Quantity One program を用いて、ハウスキーピング遺伝子 GAPDH (glyceraldehydes - 3 - phosphate dehydrogenase) と正規化した。特異的プライマ対は次の通りである：

40

【 0 1 4 6 】

5 ' - AGG GAA GCC TAC GCA GAT G - 3 ' (sense) 及び 5 ' - TGG ACA GTG GGC GAT TTT AT - 3 ' (antisense) for Robo1; 5 ' - AGC CCC ACA CAA ACA A GG - 3 ' (sense) 及び 5 ' - AAG CTG GGC TTG CTG TA

50

G G - 3' (antisense) for Robo2; 5' - GCA GCG C
TC AAC CCT AGT - 3' (sense) 及び 5' - CTT CTG GC
C CAA CTC TTG AC - 3' (antisense) for Robo3;
5' - CGC ATG TCT CTG ACC CCT AC - 3' (sense) 及
び 5' - GAG CTG TTA GCT TGG TGC AA - 3' (antise
nse) for Robo4; 並びに 5' - ACT TTG TCA AGC TC
A TTT CC - 3' (sense) 及び 5' - TGC AGC GAA CTT T
AT TGA TG - 3' (antisense) for GAPDH。増幅プロトコル
は 95 で 30 秒間変性 (denaturation)、60 で 30 秒間アニーリング (annealing) 及び 72 で 30 秒間伸長 (extension) の 30 サイクル
で構成した。PCR 産物は 1% アガロースゲル上で分離して EtBr で染色し、UV 下
で視覚化した。

10

【0147】

定量的な PCR は Light Cycler 480 (Roche) を用いて行い、O
PG (osteoprotegerin)、RANKL、ALP (alkaline ph
osphatase)、OCN (osteocalcin)、TRAP、CatK (cath
epsin K)、MMP - 9 (matrix metalloproteinase - 9) お
よび CTR (calcitonin receptor) の遺伝子発現の水準は、Li
ght Cycler 480 SYBR Green I Master Mix (Ro
che) を用いて測定した。PCR 増幅は 2 回 (in duplicate) 行い、水は
陰性対照群として、各結果物 (each run) で cDNA を代替するのに使用した。特
異的プライマの配列は次の通りである: 5' - CAC GGC CAT CCT AT
A TGG TAA - 3' (sense) 及び 5' - GAG ACA TTT TCC C
GT TCA CC - 3' for ALP; 5' - GCT ACC TTG GAG
CCT CAG TC - 3' (sense) 及び 5' - CTC GTC ACA AGC
AGG GTT AAG - 3' (antisense) for OCN; 5' - GC
A TTA TGA CCC AGA AAC TGG T - 3' (sense) 及び 5'
- TAG GTG CCA GGA GCA CAT TT - 3' (antisense
) for OPG; 5' - AGC GCA GAT GGA TCC TAA CA
- 3' (sense) 及び 5' - GAG TCC TGC AAA TCT GCG TT
- 3' (antisense) for RANKL; 5' - CGA CCA TTG
TTA GCC ACA TAC G - 3' (sense) 及び 5' - TCG TCC T
GA AGA TAC TGC AGG TT - 3' (antisense) for T
RAP; 5' - ATA TGT GGG CCA GGA TGA AAG TT - 3'
(sense) 及び 5' - TCG TTC CCC ACA GGA ATC TCT -
3' (antisense) for CatK; 5' - TGT CTG GAG AT
T CGA CTT GAA GTC - 3' (sense) 及び 5' - TGA GTT C
CA GGG CAC ACC A - 3' (antisense) for MMP - 9;
5' - AGT TGC CCT CTT ATG AAG GAG AAG - 3' (s
ense) 及び 5' - GGA GTG TCG TCC CAG CAC AT - 3' (a
ntisense) for CTR; 並びに 5' - CTC CAC TCA CGG C
AA ATT CA - 3' (sense) 及び 5' - GCC TCA CCC CAT T
TG ATG TT - 3' (antisense) for GAPDH。前記反応プロト
コルは、FastStart DNA の重合酵素を活性化するために、95 で 10 分間
前反応、95 で 10 秒間、55 で 15 秒間及び 72 で 20 秒間セット (set) であ
る 45 サイクルの増幅を含んだ。結果物は GAPDH と正規化した。

20

30

40

【0148】

実験方法 9. siRNA のトランスフェクション

【0149】

NFATc1 (Mm_NFATc1_6; Qiagen)、Robo1 (MSS2086

50

73;Invitrogen)、Robo2(MSS241005;Invitrogen)に対するsiRNA及びnonsense siRNA(Stealth RNAiTM siRNA negative control;Invitrogen)を製造会社の説明書に従ってlipofectamine試薬(Invitrogen)でトランスフェクションした。簡単に説明すると、10%FBSを含む - MEMで細胞を培養した後、OPTI-MEM(Invitrogen)にあるsiRNA-試薬の混合物を添加した後、細胞を追加で6時間さらに培養した。以降、前記培地は新鮮な完全 - MEMに交換した後、細胞を2日間さらに培養した。

【0150】

実験方法10. ラメリポディア(lamel lipodia)の確認

10

【0151】

MC3T3-E1細胞を24ウェルプレートに24時間シーディングした後、split 3があったりなかったりする状態で24時間starveさせた。前記細胞を固定し、PBS(phosphate-buffered serum)で二回洗浄した。前記細胞を100ng/mL ファロイジン(phalloidin;Molecular Probes, Leiden, Netherlands)で37℃で30分間培養した。免疫蛍光のイメージは、蛍光顕微鏡(Olympus)を用いてキャプチャーした。

【0152】

実験方法11. 石灰化結節の形成

【0153】

20

一次マウスBMSCsを12ウェルプレートに 6×10^6 細胞/ウェルの密度でシーディングし、10%FBS(v/v)、100U/mLのペニシリン及び100mg/Lのストレプトマイシンが補充された - MEMで、37℃で5%CO₂及び95%空気で加湿されたインキュベータで7日間培養した。7日後、非付着細胞は除去し、以降BMSCs(bone marrow stromal cells)を示す付着細胞はBMSCsの骨芽細胞の分化を誘導するための分化培地(- MEM containing 10% FBS[v/v]supplemented with 8mM - glycerophosphate and 50µg/mL ascorbic acid)で14日まで追加的な期間で成長させた。前記培地は毎2日または3日毎に交換した。14日目、培養物を70%エタノールで1時間固定した後、40mM Alizarin red S(Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)で染色した。

30

【0154】

実験方法12. TRAP染色及び吸収の分析

【0155】

一次マウスBMSCsは30ng/mL M-CSF及び50ng/mLの可溶性RANKLで4日間培養した。付着細胞は固定し、製造会社の説明書に従ってleukocyte acid phosphatase kit(Sigma-Aldrich)を用いて破骨細胞の酵素的マーカーである、TRAPで染色した。3つ以上の核(nuclei)を含むTRAP-陽性多核細胞を破骨細胞と見なし、光学顕微鏡(Olympus)下でカウントした。

40

【0156】

吸収領域の測定のために、BMSCs(5×10^4 cells/well)を30ng/mL M-CSF及び50ng/mLの可溶性RANKLと共に象牙質ディスク(dentine discs)上に位置させた。10日後、前記スライドを5%次亜塩素酸{じあえんそさん}ナトリウム水溶液で洗浄して細胞を除去した後、吸収ピット(pits)をヘマトキシリンで染色した。BMSCs数当たり吸収された領域の測定のために、TRAP染色を象牙質ディスク上でヘマトキシリンの染色以前に行った。吸収ピットの領域は、Quantity One Software(VersaDoc Model 3000 Imaging system, Bio-Rad, Berkeley, CA, USA)を用いて分析した。

50

【0157】

実験方法13. 生体内頭蓋冠骨の形成モデル

【0158】

4週齢のC57BL/6マウスに3週間で週5日、一日に一回、PBSまたは300 µg/kgのslit3を頭蓋冠(calvaria)に皮下に注射した。注射は縫合(lambdoidal suture)及び冠状縫合(coronal suture)の間にある頭蓋冠の矢状面(calvarial sagittal)の左側で施行し、右側は対照群として使用された。前記動物を犠牲させ、頭蓋冠を4%PFA(paraformaldehyde)で固定させた。各頭蓋冠は14%EDTAで石灰質を除去し、凍結切片(frozen section)用OCT(optical cutting temperature)化合物に包埋した。サンプルを7 µmの切片に切削した後、ヘマトキシリン及びエオシンで染色した。頭蓋冠骨の幅は、光学顕微鏡で測定した。

10

【0159】

実験方法14. 生体内頭蓋冠骨消失モデル

【0160】

6週齢のC57BL/6マウスを4つのグループに分けた:対照群(0.1%BSA+PBS);slit3-処理群(0.1%BSA+300 µg/kg slit3);IL-1-誘導された頭蓋冠骨消失群(2 µg IL-1+PBS);及びIL-1骨消失及びslit3-処理群(2 µg IL-1+300 µg/kg slit3)。前記溶液で処理されたコラーゲンスポンジ(Cellmatrix Type I-A;Nitta Gelatin Inc., Osaka, Japan)を矢状縫合(sagittal suture)の中央にある頭蓋冠に移植した。前記マウスを移植7日後に犠牲させ、頭蓋冠を4%PFAに固定させた。各頭蓋冠を14%EDTAで石灰質を除去し、凍結切片用OCT化合物に包埋した。サンプルを7 µm切片に切削した後、ヘマトキシリン及びエオシンで染色した。頭蓋冠骨の幅は、光学顕微鏡で測定した。

20

【0161】

実験方法15. 骨髓腔(bone marrow cavity)の移植

【0162】

本発明者は、11週齢のC57BL/6マウスを使用した。脛骨(tibia)を23ゲージ針で丁寧に穴を開けた。PBS(left tibia)又は300 µg/kgのslit3(right tibia)でGFP-標識されたMC3T3-E1細胞を31ゲージ針を用いて骨髓腔に注入した。前記マウスは、2日または3日後に犠牲させ、脛骨は4%PFAに固定させた。それぞれの脛骨を14%EDTAで石灰質を除去し、凍結切片用OCT化合物に包埋した。GFP陽性細胞の数をカウントするために、サンプルを蛍光顕微鏡(Olympus)下に位置されたスライド上で観察した。

30

【0163】

実験方法16. slit3ノックアウトマウス胚でVon Kossa染色及びVEGF免疫組織化学染色

【0164】

slit3突然変異胚は、Mutant Mouse Regional Resource Centers(stock number 030759-MU;Columbia, MO, USA)から購入した、雄性及び雌性のslit3 +/- C57BL/6Jマウスを交配して製造した。胚組織はPBSから収集し、室温で一晩10%ホルマリンに固定させた。組織化学の分析のために、野生型及びslit3突然変異の17.5日(E17.5)された胚を4%PFAで固定させ、OCT化合物に包埋させた。7 µm切片をVon Kossa反応及びヌクレアファストレッド(nuclear fast red)で染色した。For IHC staining, peroxidase chromogens(Invitrogen)were used。免疫組織化学(IHC)染色のために、ペルオキシダーゼクロモゲン(peroxidase chromogens, Invitrogen)を使用した。前記切片を10分間メタノールに溶かした3%

40

50

H₂O₂にクエンチ (quench) した後、PBSで洗浄し、PBSで1:200または1:500で希釈された抗-VEGF抗体 (Abcam) で室温で1時間反応させた。抗体結合に対する信号はDAB (diaminobenzidine) 基質で視覚化した。全てのサンプルは光学顕微鏡で評価した。

【0165】

実験方法17. 骨密度測定

【0166】

全身骨密度 (BMD) は密度測定器 (Lunar PIXImus densitometer software version 1.4; GE-Lunar Co., Madison, WI, USA) を用いて、二重エネルギー放射線吸収法 (dual-energy X-ray absorptiometry) で測定した。変動係数 (coefficient of variation, CV) で表示される、装備の精密度は1.27%であった。前記マウスを40mg/kg Zoletil 50 (Virbac, France) 及び5.6mg/kg Rompun (Bayer Korea, Seoul, Korea) の混合物で筋肉内に注射して麻酔させ、四肢を伸ばした腹臥位 (prone position) 状態でスキャナに位置させた。

【0167】

実験方法18. シークエンシング

【0168】

本発明者は、染色体4にあるslit2遺伝子 (NM_004787)、染色体5にあるslit3遺伝子 (NM_003062)、染色体3にあるrobo1遺伝子 (NM_001145845)、染色体3にあるrobo2遺伝子 (NM_NM_002942)、及び染色体11にあるrobo4遺伝子 (NM_019055) について調査した。これらの遺伝子に対するターゲット領域は、全体コーディングエクソン、エクソン-イントロンバウンダリー、及び調節領域であった。ベイトライブラリ (bait libraries) をデザインし、Agilent eArray website functionality (<https://earray.chem.agilent.com/earray/>) を用いて、これらのターゲットゲノム領域にわたってカバリッジを分析した。BLAST (~12 mismatches across the bait) を用いて90%以上に一つ以上の位置がベイトマッピングされる場合、デザインから除外した。最終的に、6,507bpターゲット領域がAgilent SureSelect Sequence Enrichment Kitと確定された。続いて、Illumina HiSeq2000 analyzer (Illumina, San Diego, CA) でシークエンシングを982閉経後の女性 (super-normal BMD group=501, and severe-low BMD group=481) に行った。Covaris Systemを用いて3のゲノムDNAを無作為に使用し、150bpのインサート (inserts) を製造した。この断片化したDNAをT4 DNA重合酵素及びKlenow重合酵素を用いて末端修復 (end-repair) し、修復した末端受容体オリゴヌクレオチド (Illumina paired-end adaptor oligonucleotides) を付着末端 (sticky ends) に付けた。アガロース電気泳動でライゲーション混合物を分析し、200-250bp大きさの断片で精製した。精製されたDNAライブラリをSureSelect Target Enrichment probes set (Agilent, Santa Clara, CA) で混成化させ、製造会社の説明書に従ってタグされた領域にキャプチャーした。キャプチャーされたライブラリを用いて、製造会社のプロトコルに従って、HiSeq2000 paired-end flowcellを製造した。次に、PCRコーンのクラスターをHiSeq2000 platformでシークエンシングした。

【0169】

実験結果1. 初期の分化段階で、破骨細胞は骨芽細胞前駆体を誘引する潜在的なカップリング因子を分泌する。

10

20

30

40

50

【0170】

前記カップリング現象を調査するための試験管内システムを確立するために、破骨細胞の生成及び骨吸収に対する可変の培養条件を準備した。本発明者は、BMMsを30 ng/mL M-CSFがある状態で100 ng/mL RANKLで2日及び6日間処理し、初期 - 及び後期 - 破骨細胞の分化をそれぞれ誘導した。吸収段階を誘導するために、BMMsを30 ng/mL M-CSFがある状態で100 ng/mL RANKL及びマウス的大腿骨 (femur) と共に10日間培養した。破骨細胞の分化及び骨吸収は、各培地でTRAP-5b活性及びCTX濃度をそれぞれ測定することによって評価した。

【0171】

図1aで見る通り、RANKL - 処理された細胞から得たCMは、毎段階の非処理群と比較し、TRAP-5b活性が著しく増加した。また、図1bで見る通り、CTX濃度は大腿骨とRANKLが全てある状態でのみ増加した。

10

【0172】

各段階で破骨細胞の培養物から収集されたCMを一次マウス頭蓋冠の骨芽細胞及びMC3T3-E1細胞に処理した。RANKL - 処理されたBMMsの任意の培地は、非処理群の上層液と比較し、一次骨芽細胞の生存力または分化 (それぞれ図2aと2c)、またはMC3T3-E1細胞の生存力または分化 (それぞれ図2bと2d) に有意な影響を与えなかった。しかし、傷 - 治癒の分析は、RANKL - 処理されたBMMsから得たCMが非処理群と比較し、骨芽細胞 (図2e) 及びMC3T3-E1細胞 (図2f) 全ての運動性 (motility) を顕著に増加させることを示す。RANKL - 処理されたRaw264.7細胞から得たCMもまたMC3T3-E1細胞の運動性を増加させた (図2g)。特に、後期の分化段階でRANKL - 処理された細胞から収集されたCMがさらに小さい程度に前骨芽細胞の運動性を刺激させるが、初期の分化段階でRANKL - 処理された細胞から得たCMは、前骨芽細胞の運動性を最も著しく増加させた。反面、10日間RANKLで培養した破骨細胞から得たCMは、マウス的大腿骨があるか否かと関係なく運動性を刺激しなかった。

20

【0173】

このような結果は、可能性のあるカップリング因子 (possible coupling factors) が骨吸収の過程からではなく、主に初期 - 分化した破骨細胞から分泌され得るということを意味する。

30

【0174】

骨芽細胞系統の方向性のある移動 (directional migration) に対する破骨細胞CMの効果を評価するために、本発明者は、Boyden chamber assayを使用した。RANKL - 処理されたBMM及びRaw264.7細胞両方から収集されたCMもまた、非処理対照群と比較し、MC3T3-E1細胞の方向性のある可動性 (mobilization) を顕著に刺激した (それぞれ図2hと2i)。このような結果は、初期の破骨細胞生成から誘導された因子による前骨芽細胞の補充 (preosteoblastic recruitment) の刺激が、骨 - 再形成部位でカップリング現象の主要なメカニズムになり得ることを説明する。

40

【0175】

実験結果2 . 推定走化性因子の同定

【0176】

前骨芽細胞に対するケモカインに作用する特異タンパク質を同定するために、本発明者は、LC-MS/MS分画化した。簡単に説明すると、RANKL - 処理及び - 非処理されたRaw264.7細胞から得たCMの96つのマッチされた分画をMC3T3-E1細胞に処理し、これらの細胞の可動性に対する効果をBoyden chamber assayを用いて比較した。本発明者は、MC3T3-E1細胞の移動に対する最も差がつく効果を示すマッチされた分画を選別した。前記実験方法欄に記述された、プロテオミクス分析を選別された分画及び隣接したRANKL - 処理された分画に対して行った。本発明者は、隣接した分画及びRANKL - 非処理対照群と比較し、RANKL - 処理された

50

分画で差がつくように発現する45つのペプチドを同定した。これらのうち、9つのペプチドが分泌特性を有していた(表1)。最終的に、slit3タンパク質を選択し、以降実験を行った。

【0177】

【表1】

Accession number	Name	MASCOTS core	Molecular weight	Matched peptides
O89020	Afamin	42	69.3	6
Q80T21	ADAMTS-like protein 4	33	113.3	3
Q9Z319.2	Atrial natriuretic peptide	37	123.0	4
P09470	Angiotensin-converting enzyme	38	150.8	3
Q9WVB4	Slit 3	34	167.7	3
Q61292	Laminin β_2	40	196.2	4
NP_808531	Fras-1	33	244.4	4
NP031756	Collagen α -1 chain	39	333.4	7
NP_067383	Usherin	40	569.4	5

10

20

【0178】

実験結果3. Slit3は、分化した破骨細胞から分泌される。

【0179】

分化した破骨細胞でslit3の分泌可否を確認するために、下記のような実験を行った。BMMs (bone marrow macrophages) を30 ng/mL M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) が含まれた培地下で、100 ng/mL RANKLの処理可否を区分して2日間培養し、前記細胞でウェスタンブロットを行った。また、破骨細胞の形成過程 (osteoclastogenesis) に関与することがよく知られているマスター遺伝子であるNFATc1のsiRNAを用いてBMMsで破骨細胞の形成過程を遮断し、同じ方法でウェスタンブロットを行った。その結果をそれぞれ図3a及び図3bに示した。

30

【0180】

図3aに示すように、slit3の発現は、分化した破骨細胞の細胞溶解物 (lysate) 及びCM (conditioned media) で全て顕著に増加することを確認した。

40

【0181】

また、図3bに示すように、RANKLにより刺激されたslit3の発現は、NFATc1-siRNAにより完全に遮断されたことを確認した。

【0182】

前記結果を通じ、slit3は分化した破骨細胞から分泌され、破骨細胞の前駆体では分泌されないことを確認した。

【0183】

実験結果4. Slit3は骨芽細胞の移動、生存力、増殖、分化及びOPGの生成を刺激する。

50

【0184】

骨芽細胞で *s l i t 3* の機能を確認するために、MC3T3-E1 骨芽細胞を組換え *s l i t 3* で処理した後、骨芽細胞の移動 (*m i g r a t i o n*)、生存能 (*v i a b i l i t y*)、増殖 (*p r o l i f e r a t i o n*)、分化 (*d i f f e r e n t i a t i o n*) 及び OPG (*o s t e o p r o t e g e r i n*) の生産に及ぼす影響を確認した。その結果をそれぞれ図 4 a 乃至 4 g に示した。

【0185】

図 4 a に示すように、MC3T3-E1 骨芽細胞を *s l i t 3* (0、0.1、0.5、及び 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) で 24 時間処理した結果、*s l i t 3* の濃度に依存的に前骨芽細胞 (*p r e o s t e o b l a s t*) の移動が増加することを確認した。

10

【0186】

また、図 4 b 及び図 4 c に示すように、MC3T3-E1 骨芽細胞を *s l i t 3* (0、0.1、0.5、及び 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) で 48 時間処理し、CCK-8 アッセイ及び Brd-U アッセイを行った結果、*s l i t 3* の処理により骨芽細胞の生存能及び増殖が増加することを確認した。CCK-8 アッセイで IGF-1 は陽性対照群に用いた。

【0187】

さらに、図 4 d に示すように、1 次 (*p r i m a r y*) マウス BMSCs (*b o n e m a r r o w s t r o m a l c e l l s*) を 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ *s l i t 3* で処理し、骨芽細胞の分化を誘導した結果、*s l i t 3* の処理により骨芽細胞の分化マーカーである ALP (*a l k a l i n e p h o s p h a t a s e*) 及び OCN (*o s t e o c a l c i n*) の mRNA 発現が顕著に増加することを確認した。

20

【0188】

また、図 4 e に示すように、1 次マウスの頭蓋冠骨芽細胞を 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ *s l i t 3* で 48 時間処理し、QRT-PCR を行った結果、*s l i t 3* は OPG の生産を促進し、RANKL の発現には影響を与えないことを確認した。

【0189】

さらに、図 4 f に示すように、細胞移動過程で細胞方向に移動させ、実質的に運動に関与するラメリポディア (*l a m e l l i p o d i a*) の形成が刺激され、これは走化性 (*c h e m o t a c t i c a c t i o n*) があることを意味する。

【0190】

前記結果を通じ、*s l i t 3* は骨芽細胞で移動、生存能、増殖、分化及び OPG の生産を増加させる機能をし、これを通じて骨形成過程に寄与することを確認した。

30

【0191】

実験結果 5 . *S l i t 3* は頭蓋冠の骨形成を増加させ、IL-1 誘導された頭蓋冠の骨消失を防止する。

【0192】

骨細胞に対する *s l i t 3* の試験管内結果を検証するために、動物モデルを用いた実験を行った。*s l i t 3* を頭蓋冠に直接注入した結果、非処理対照群と比較し、15% まで骨の幅が増加した (図 5)。また、動物モデルの頭蓋冠の骨消失で、IL-1 を処理して骨消失を誘導したとき、*s l i t 3* が IL-1 による骨消失を抑制することを証明した (図 6)。このような結果は、*s l i t 3* が骨形成を増加させると同時に、骨吸収を減少させる治療剤として使用されることができるということを意味する。

40

【0193】

実験結果 6 . *S l i t 3* は骨形成の表面に MC3T3-E1 細胞の移動を刺激する。

【0194】

GFP-標識された MC3T3-E1 細胞を骨髓腔に注入させる場合、*s l i t 3* の処理は PBS 処理群と比較し、骨形成の表面に細胞の移動を顕著に増加させる (図 7)。

【0195】

実験結果 7 . *s l i t 3* ノックアウトマウス胚で骨形成及び血管新生が顕著に弱くなる

50

【0196】

17.5日された *slit3* マウス胚の大腿骨でカルシウムの蓄積を評価するために、*Von Kossa* 染色を行い、血管の形成を評価するために *VEGF IHC* 染色を行った。*slit3* - ノックアウト胚は、*Von Kossa* (図8a) 及び *VEGF IHC* (図8b) の二つの方法による染色が野生型胚と比較して殆ど示されなかった。このような結果は、*slit3* は骨形成に継続的に寄与するとともに、血管新生に対する必須因子である *VEGF* の発現を増加させるのに重要な役割をするということを意味する。

【0197】

実験結果8. 骨細胞に対する *slit3* の作用は、*Robo1* 及び *Robo2* 受容体を介して媒介される。

10

【0198】

slit リガンド及び *Robo* 受容体は、多様なタイプの細胞で信号伝達経路がよく知られているため (*Dickinson RE, et al., Reproduction* 2010;139:697-704)、本発明者は、*RT-PCR* を行って骨細胞で *Robo* 受容体の発現を調査した。

【0199】

その結果、*MC3T3-E1* 細胞は、*Robo1* 及び *Robo2* 受容体を発現することを確認した (図9a)。一次破骨細胞は、*Robo1* 受容体を主に発現する反面、*Robo3* 及び *Robo4* 受容体の発現の水準は弱く増加した (図9b)。*MC3T3-E1* 細胞で *siRNA* トランスフェクション及び *fc* キメラによる *Robo1* 及び *Robo2* の発現を遮断する場合、*slit3* - 刺激された細胞の移動及び増殖が抑制された (それぞれ、図9c-9d)。一次破骨細胞に関して、*Robo1* 受容体に対する *siRNA* トランスフェクションは、*slit3* の処理による破骨細胞の形成の減少を完全に回復させた (図9e)。

20

【0200】

実験結果9. *Vilse* は骨芽細胞と破骨細胞で *Robo1* 受容体を介して、*slit3* の作用を媒介する主要な信号分子である。

【0201】

ヒト *BMSC* とヒト *PBMC* から生成された、*GFP-Robo1* は、骨芽細胞 (図10a) と破骨細胞 (図10b) に *Myc-vilse* とともにそれぞれトランスフェクションする場合、*slit3* の処理は共免疫沈降法で *Robo1-Vilse* の相互作用を顕著に増加させた。*siRNA* で *vilse* のノックダウンさせると、*MC3T3-E1* 細胞の *slit3* - 刺激された生存力を抑制した (図10c)。このような結果は *Robo1* 受容体を介した *slit* の作用が骨細胞で *vilse* により媒介され得るということを意味する。

30

【0202】

実験結果10. 全身 *BMC* は *Robo1* - ノックアウトマウスで顕著に減少した。

【0203】

8週齢の雄 *Robo1* 野生型、ヘテロ型 (*heterozygote*) 及びノックアウトマウスで全身 *BMC* 値を比較した結果、*Robo1* - ノックアウトマウスは顕著に低い *BMD* 値を示した (図11)。

40

【0204】

実験結果11. *slit1* 及び *slit2* は破骨細胞の分化を弱化させる。

【0205】

TRAP 染色を行うことによって、破骨細胞に対する *slit* ファミリの他のタンパク質、*slit1* 及び *slit2* の効果を試験した (図12)。*slit1* 及び *slit2* は、*slit3* により観察されるように、破骨細胞の分化を容量 - 依存的に減少した。

【0206】

実験結果12. 組換えの *slit3* LRR2 ペプチドは、破骨細胞の分化を弱化させる。

50

【0207】

s l i t タンパク質のL R R 2ドメインは、それらの受容体、R o b oと結合するものと報告されている。従って、本発明者は、L R R 2ドメインペプチドとしてs l i t 3の小さい組換えペプチドを製造した。前記組換えのペプチドは、破骨細胞の分化を抑制することが確認された(図13)。このような結果は、組換えのペプチドが骨粗鬆症の治療に有用に使用されることができることを意味する。

【0208】

実施例13. 臨床実験

【0209】

13-1. 実験対象の選定

10

【0210】

実験対象は、ソウルA S A N病院(Seoul, Korea)に来院した健康な閉経後の女性を対象にした。前記全ての女性は、骨粗鬆症の可能性を懸念して訪問した場合、または健康検診で骨粗鬆症が検出された場合であった。このときの閉経は、1年以上無月経が持続された場合であって、血清内F S H (f o l l i c l e s t i m u l a t i n g h o r m o n e)の濃度を測定して検証した。実験対象のうち、40歳以前に閉経した実験対象、骨代謝に影響を与えるだけの薬剤を6ヶ月以上または12ヶ月以内に投与を受けた実験対象及び骨代謝に影響を与えるだけの疾患を病んだ実験対象は除外した。最終的に346名の女性を選定した。

【0211】

20

13-2. 骨密度(Bone mineral density、BMD)の測定

【0212】

前記13-1で選定した実験対象の年齢、体重、身長、B M I、行動要因(喫煙、飲酒、運動等)、骨密度等を測定した。

【0213】

骨密度(BMD、 g/cm^2)はD X A (Lunar; Prodigy, Madison, WI, USA)を用いて、腰椎(lumbar spine, L1-L4)及び大腿近位部(proximal femur)のうち、大腿頸部{だいたいけいぶ}(femur neck)、大腿骨(total femur)、転子部(trochanter)、大腿骨の骨幹(shaft)、三角(ward)を測定した。

30

【0214】

その結果を下記表2に示した。

【0215】

【表2】

変数	実験対象 (n = 346)
年齢(歳)	59.6 ± 7.1
体重(kg)	55.6 ± 6.9
身長(cm)	155.2 ± 5.2
体質量指数(BMI) (kg/m^2)	23.1 ± 2.7
閉経期間	9.7 ± 7.1
喫煙者、名(%)	6 (1.7%)
飲酒 ≥ 3 U/日、名(%)	9 (2.6%)
運動 ≥ 30分/日、名(%)	172 (49.7%)
骨密度(Bone mineral density) (g/cm^2)	
腰椎(Lumbar spine)	0.882 ± 0.099
大腿頸部(femur neck)	0.760 ± 0.085
全大腿骨(total femur)	0.819 ± 0.091
三角(ward)	0.556 ± 0.091
転子部(trochanter)	0.641 ± 0.084
骨幹部(shaft)	0.993 ± 0.119

40

50

【0216】

13-3. 血中s l i t 3の濃度測定

【0217】

前記13-1で選定した実験対象の空腹血液のサンプルを遠心分離した後、上澄液を分離した。血中s l i t 3の濃度は、s l i t 3の競争的なE L I S Aキット(E c h e l o n B i o s c i e n c e s I n c , S a l t L a k e , U T , U S A)を用いて測定し、2回繰り返した。前記結果値を各骨の位置でのBMDまたはT - s c o r eを従属変数(d e p e n d e n t v a r i a b l e)として、s l i t 3の濃度を独立変数(i n d e p e n d e n t v a r i a b l e)として用いて多重線形回帰分析(M u l t i p l e l i n e a r r e g r e s s i o n a n a l y s i s)を行った。その結果を表2に示した。共変量(C o v a r i a t e s)は、年齢、体重、身長、喫煙、飲酒及び定期的な運動を含んだ。

【0218】

【表3】

位置	変数	S t a n d a r d i z e d β - c o e f f i c i e n t s	P値	位置	変数	S t a n d a r d i z e d β - c o e f f i c i e n t s	P値
腰椎 (L u m b a r s p i n e)	BMD	0.123	0.029	三角 (w a r d)	BMD	0.178	0.001
	T-s c o r e	0.146	0.010		T-s c o r e	0.118	0.026
大腿頸部 (f e m u r n e c k)	BMD	0.138	0.012	転子部 (t r o c h a n t e r)	BMD	0.098	0.074
	T-s c o r e	0.164	0.003		T-s c o r e	0.099	0.069
全大腿骨 (t o t a l f e m u r)	BMD	0.126	0.022	幹部 (s h a f t)	BMD	0.128	0.021
	T-s c o r e	0.162	0.003				

【0219】

表3に示すように、可能性のある交絡変数(c o n f o u n d i n g f a c t o r)への補正後に、血中s l i t 3の濃度は、腰椎、大腿頸部、全大腿骨、大腿三角、大腿骨幹部でのBMD値及びT - s c o r eと関連性があることを確認した。

【0220】

また、s l i t 3の濃度に応じて5分位にグループを分けた後、骨粗鬆症の発病率を観察した。WHOによると、腰椎、大腿頸部、全大腿部のいずれか1つでのT - s c o r e - 2.5 S Dであるとき、骨粗鬆症と定義する。その結果を下記表4に示した。

【0221】

【表 4】

s l i t 3 の 5 分 位 の 数	発 病 率 (%)	O R s (9 5 % C I) *
Q 1 (1 . 1 - 4 . 8 n g / m L)	5 4 . 5	1 (R e f .)
Q 2 (4 . 9 - 6 . 3 n g / m L)	4 9 . 3	0 . 8 7 6 (0 . 4 2 0 - 1 . 8 3 0)
Q 3 (6 . 4 - 7 . 5 n g / m L)	4 5 . 6	0 . 6 6 3 (0 . 3 1 6 - 1 . 3 9 1)
Q 4 (7 . 6 - 8 . 7 n g / m L)	4 7 . 1	0 . 7 1 0 (0 . 4 2 1 - 1 . 4 2 3)
Q 5 (8 . 8 - 1 4 . 1 n g / m L)	3 8 . 2	0 . 4 2 1 (0 . 1 9 7 - 0 . 9 0 0)

【 0 2 2 2 】

10

表 4 に示すように、骨粗鬆症 o d d s は共変量への補正後に、血中 s l i t 3 の濃度が最も低く示された群 (Q 1) に比べ最も高く示された群 (Q 5) で約 5 8 % 低く示されることを確認した。

【 0 2 2 3 】

前記結果を通じ、血中 s l i t 3 の濃度は、骨粗鬆症の発病率と負の相関関係を有しており、骨折及び骨粗鬆症の発生危険予測用マーカーに用いられることができることを確認した。

【 0 2 2 4 】

実験結果 1 4 . s l i t 2 、 s l i t 3 、 r o b o 1 、 r o b o 2 及び r o b o 4 にある 7 つの S N P は低い骨密度の危険と関連がある。

20

【 0 2 2 5 】

B M D 状態による遺伝学的研究対象の基準の特性は、下記表 5 の通りである。二つのグループの年齢が一致するため、年齢での特別な差はなかった。このグループの定義と一致し、B M I は極めて低い B M D グループで顕著に高い反面、腰椎 (l u m b a r s p i n e) と大腿頸部 (f e m u r n e c k) での B M D 値と T - スコアは平均以上の B M D グループで顕著に高かった。

【 0 2 2 6 】

極めて低い B M D 状態 (s e v e r e - l o w B M D s t a t u s) の危険におかれた様々な多型性 (p o l y m o r p h i s m) の遺伝的効果は、配列分析 (t a r g e t e d d e e p s e q u e n c i n g a n a l y s i s) 及びロジスティック回帰分析 (l o g i s t i c r e g r e s s i o n a n a l y s i s) により分析された (表 6) 。 s l i t 2 で 1 つの S N P (r s 7 6 5 5 0 8 4) 、 s l i t 3 で 2 つの S N P (r s 1 5 4 9 9 0 9 及び r s 1 0 0 3 6 7 2 7) 、 r o b o 1 で 1 つのダウンストリーム S N P 、 r o b o 2 で 2 つの S N P (r s 3 8 2 1 7 3 5 及び r s 7 8 8 1 7 2 4 8) 、並びに r o b o 4 で 1 つの S N P (r s 1 2 4 1 8 5 4 8) が極めて低い B M D 状態の危険と有意に関連があった。

30

【 0 2 2 7 】

【表 5】

Variables	Super-normal BMD group (n = 501)	Severe-low BMD group (n = 481)	P value
Age (years)	58.4 ± 6.3	58.8 ± 7.0	0.343
Weight (kg)	54.5 ± 5.9	55.6 ± 6.7	0.007
Height (cm)	154.9 ± 4.8	154.6 ± 5.2	0.239
Body mass index (kg/m ²)	22.7 ± 2.6	23.3 ± 2.9	0.001
Bone mineral density (g/cm ²)			
Lumbar spine	0.983 ± 0.119	0.755 ± 0.095	< 0.001
Femur neck	0.778 ± 0.092	0.656 ± 0.094	< 0.001
T-score			
Lumbar spine	-1.2 ± 0.9	-3.2 ± 0.7	< 0.001
Femur neck	-1.1 ± 0.7	-2.3 ± 0.8	< 0.001
Fracture history, no. (%)	0 (0.0%)	164 (34.1%)	< 0.001

10

20

【 0 2 2 8 】

【表 6】

Gene	Location	Chr	Position	rs ID	Genotype			MAF	HWE*	Additive		Dominant		Recessive	
										OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
SLIT2	STAR T_GAINED	4	20255306	rs7655084	TT (859)	GT (121)	GG (2)	0.064	0.429	1.673 (1.145-2.445)	0.008	1.655 (1.125-2.435)	0.011	∞	0.980
SLIT3	intron	5	168180670	rs1549909	TT (359)	CT (484)	CC (138)	0.387	0.233	0.923 (0.766-1.112)	0.399	1.067 (0.822-1.385)	0.627	0.649 (0.449-0.938)	0.021
SLIT3	exon	5	168180081	rs10036727	TT (357)	CT (487)	CC (138)	0.388	0.179	0.931 (0.772-1.122)	0.450	1.084 (0.834-1.407)	0.547	0.650 (0.450-0.940)	0.022
ROBO1	downstream	3	78647361		AA (904)	AC (69)	CC (1)	0.036	1.000	0.465 (0.278-0.781)	0.004	0.467 (0.277-0.787)	0.004	0	0.978
ROBO2	intron	3	77684222	rs3821735	CC (606)	CT (327)	TT (49)	0.216	0.579	0.787 (0.634-0.977)	0.030	0.745 (0.575-0.966)	0.026	0.761 (0.425-1.364)	0.360
ROBO2	intron	3	77626788	rs78817248	CC (950)	CG (23)	GG (1)	0.013	0.145	2.596 (1.097-6.142)	0.030	2.593 (1.062-6.333)	0.036	∞	0.978
ROBO4	exon	11	124757560	rs12418548	GG (865)	GA (112)	AA (5)	0.062	0.422	0.667 (0.459-0.968)	0.033	0.644 (0.434-0.957)	0.030	0.674 (0.12-4.077)	0.668

10

20

30

40

【0229】

Chr, chromosome; MAF, minor allele frequency; * P values for the deviation from a HardyWeinberg Equilibrium (HWE) among all subjects.

【0230】

これまで本発明についてその好ましい実施例を中心に見てみた。本発明が属する技術分

50

野で通常の知識を有する者は、本発明が、本発明の本質的な特性から外れない範囲で変形された形態で具現されることができるということを理解できであろう。従って、開示されている実施例は、限定的な観点ではなく、説明的な観点で考慮されなければならない。本発明の範囲は、前述した説明ではなく、特許請求範囲に示されており、それと同等の範囲内にある全ての差異点は、本発明に含まれているものと解釈されなければならない。

【産業上の利用可能性】

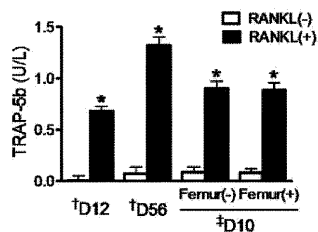
【0231】

本発明の *s l i t* または *r o b o* タンパク質は、細胞及び動物モデルで骨形成を増加させ、骨吸収を減少させて、骨粗鬆症の発病率と負の相関関係を有しており、骨折または骨粗鬆症の予防または治療用組成物及び骨折あるいは骨粗鬆症の発生危険を予測するためのバイオマーカーとして有用に利用されることができる。

10

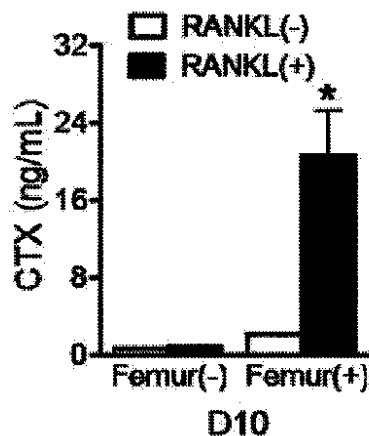
【図1a】

[Fig. 1a]



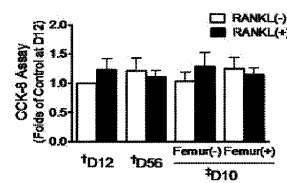
【図1b】

[Fig. 1b]



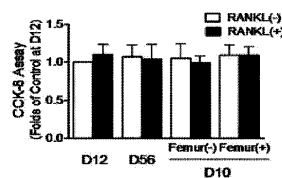
【図2a】

[Fig. 2a]



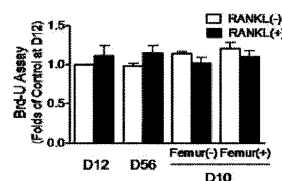
【図2b】

[Fig. 2b]



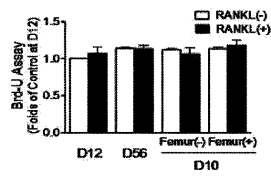
【図2c】

[Fig. 2c]



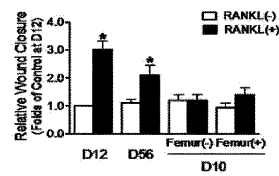
【 2 d 】

[Fig. 2d]



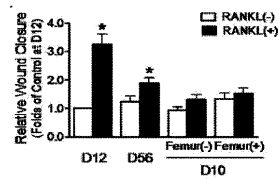
【 2 e 】

[Fig. 2e]



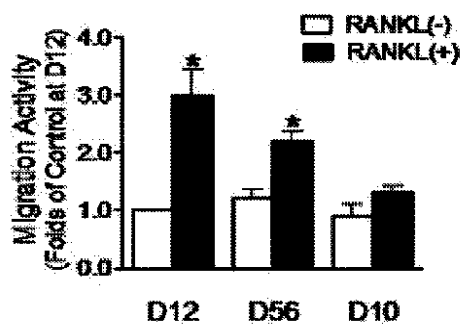
【 2 f 】

[Fig. 2f]



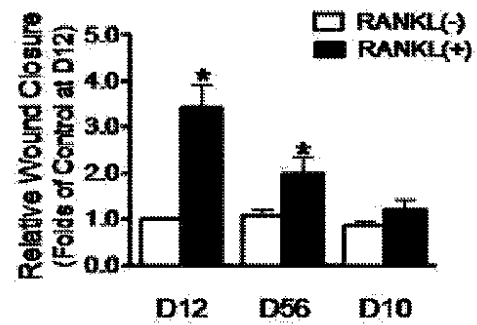
【 2 i 】

[Fig. 2i]



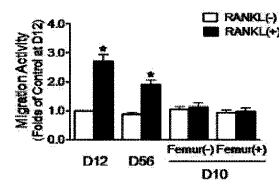
【 2 g 】

[Fig. 2g]



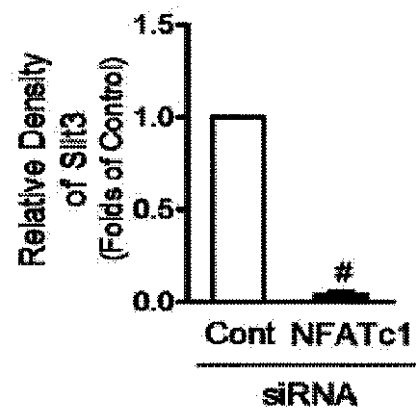
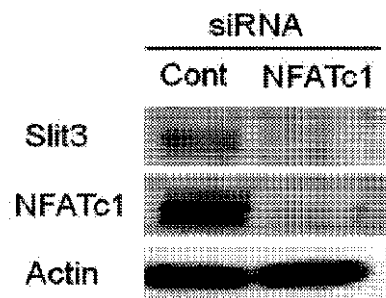
【 2 h 】

[Fig. 2h]



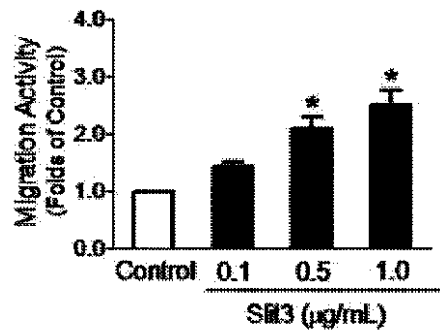
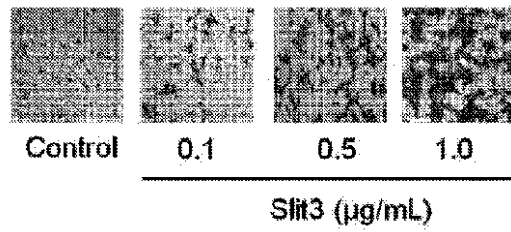
【 3 b 】

[Fig. 3b]



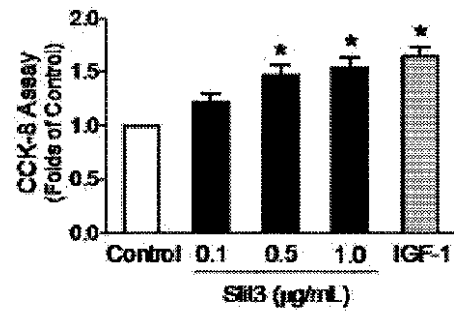
【 図 4 a 】

[Fig. 4a]



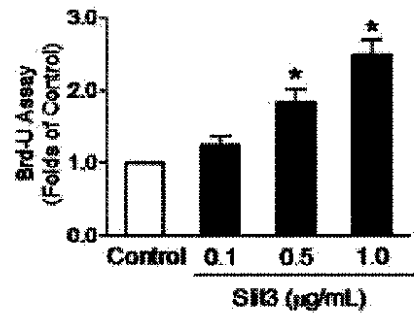
【 図 4 b 】

[Fig. 4b]



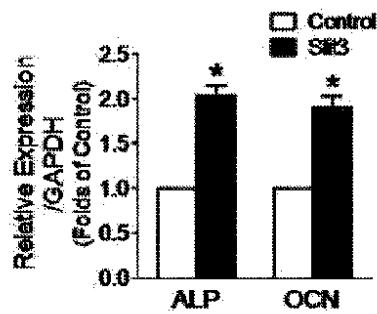
【 図 4 c 】

[Fig. 4c]



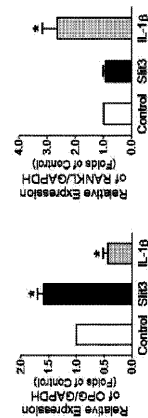
【 図 4 d 】

[Fig. 4d]



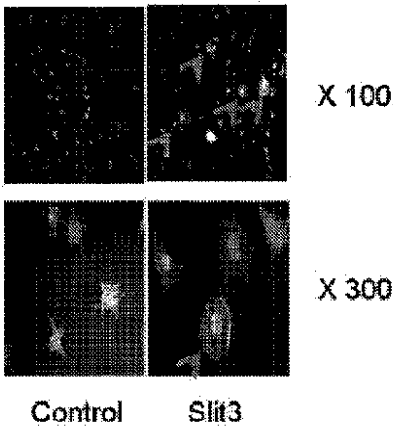
【 図 4 e 】

[Fig. 4e]



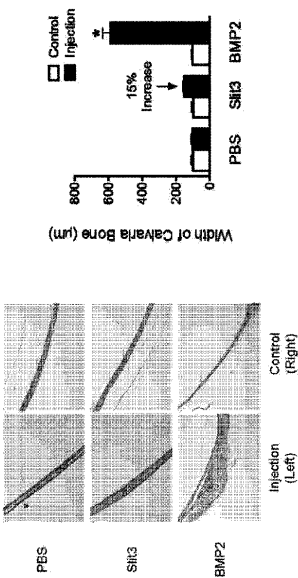
【 図 4 f 】

[Fig. 4f]



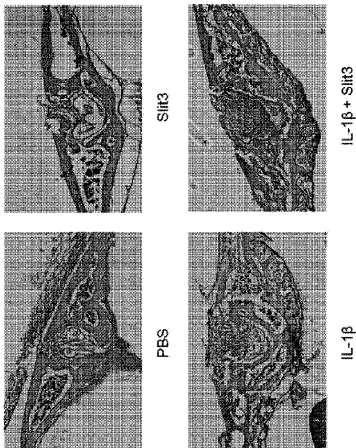
【 図 5 】

[Fig. 5]



【 図 6 】

[Fig. 6]



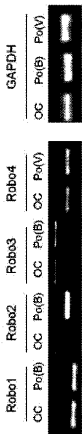
【 図 9 a 】

[Fig. 9a]



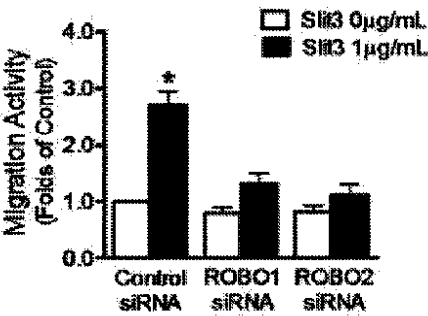
【 9 b 】

[Fig. 9b]



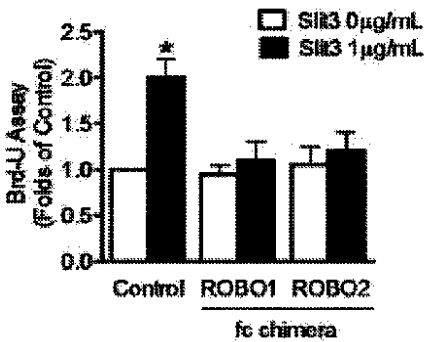
【 9 c 】

[Fig. 9c]



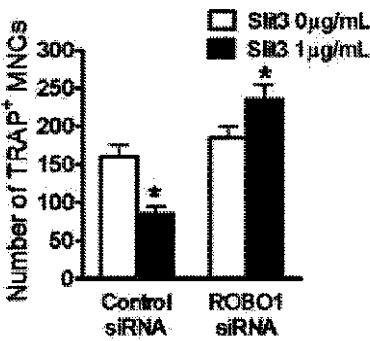
【 9 d 】

[Fig. 9d]



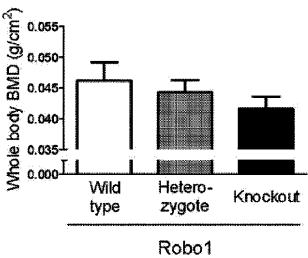
【 9 e 】

[Fig. 9e]

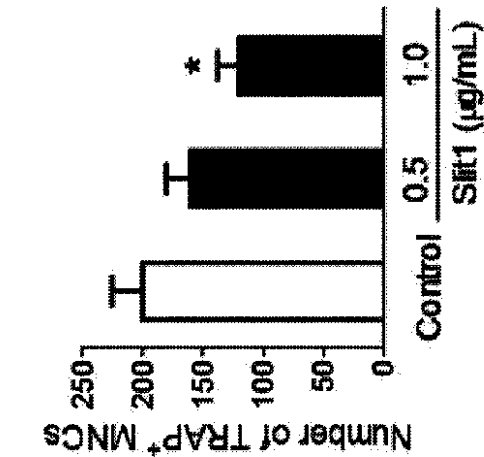


【 1 1 】

[Fig. 11]

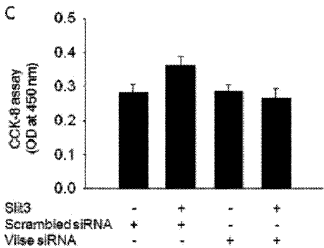


【 1 2 A 】



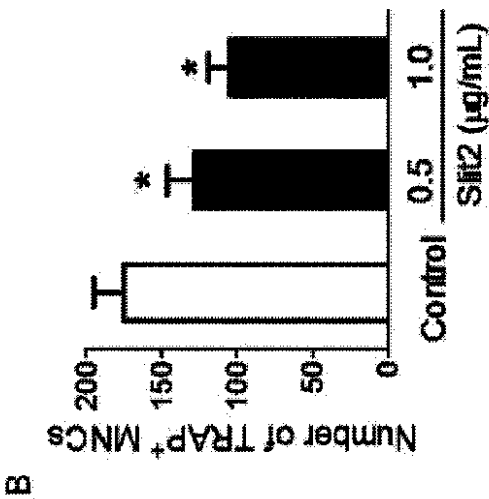
【 1 0 c 】

[Fig. 10c]

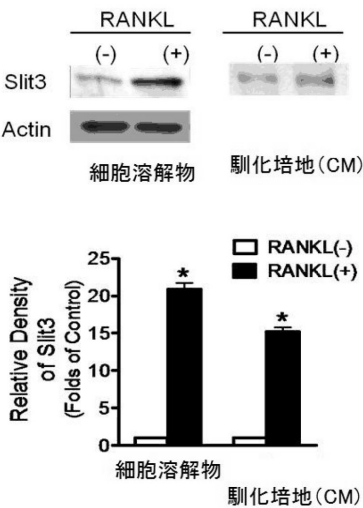


A

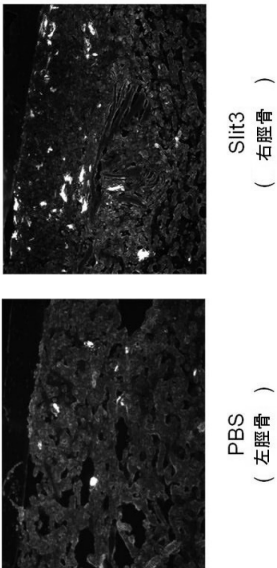
【図 1 2 B】



【図 3 a】



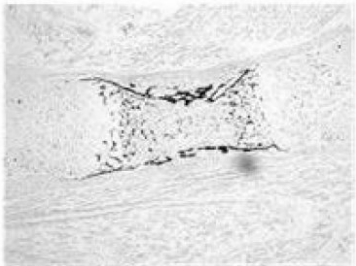
【図 7】



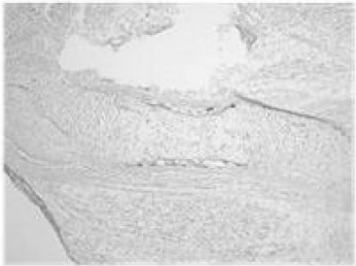
【図 8 a】

A

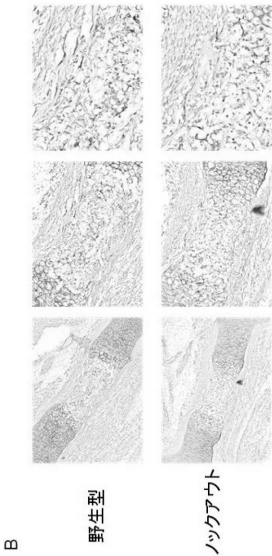
野生型



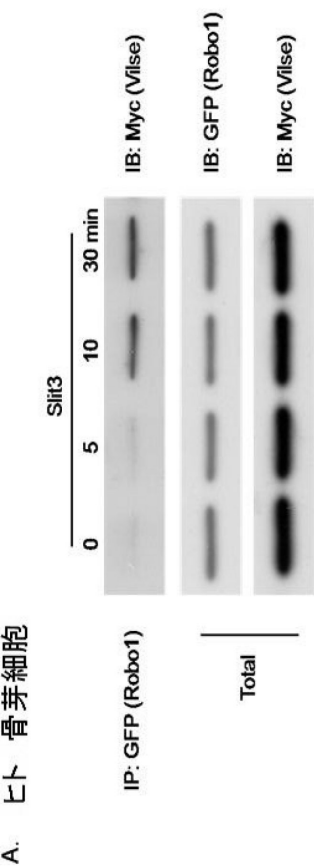
ノックアウト



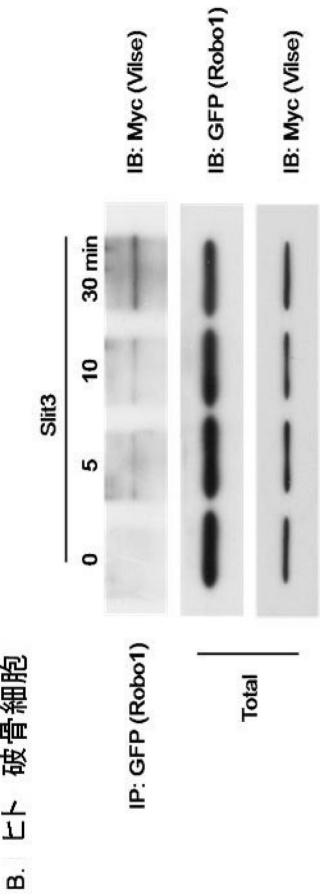
【 図 8 b 】



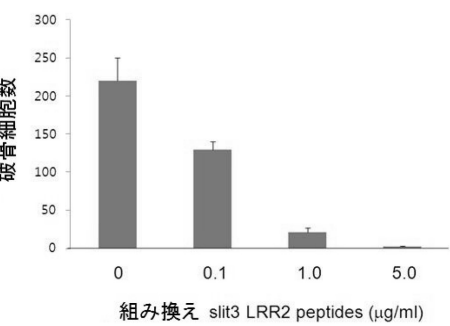
【 図 1 0 a 】



【 図 1 0 b 】



【 図 1 3 】



【配列表】

0006100367000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 キム、 ギ ス

大韓民国 135 808 ソウル カンナム グ オンジュ ロ 107 #208 804
(ゲボ ドン、ヒュンダイ 2チャ アパート)

(72)発明者 リ、 スン フン

大韓民国 427 732 キョンギ ド クワチョン シ ビョリャン ロ 111 #507
701 (ビョラン ドン、ジュコン アパート)

(72)発明者 リ、 ヨン サン

大韓民国 440 840 キョンギ ド スウォン シ ジャンアン グ 133ベオン ギル
ジョンジャ ロ 7-3 (ジョンジャ ドン)

(72)発明者 キム、 ボム ジュン

大韓民国 134 715 ソウル ガンドン グ ゴドク ロ 131 #131 501 (ア
ムサ ドン、カンドン ロッテキャッスルファースト アパート)

審査官 伊藤 基章

(56)参考文献 国際公開第2012/042289 (WO, A1)

国際公開第02/081745 (WO, A1)

特表2010-539123 (JP, A)

J Neurosci, 2010年, Vol.30, No.28, p.9445-53

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 38/00

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)